

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID

CAUSAS GENETICAS DE LAS
SORDERAS DFNB4: EL SINDROME DE
PENDRED Y LA SORDERA NO
SINDROMICA EVA

Memoria que presenta Alejandra Pera Rojas,
Licenciada en Biología,
para optar al grado de Doctor

Directores de Tesis:
Dra. Concepción Hernández Chico
Dra. Manuela Villamar López

Unidad de Genética Molecular
Hospital Ramón y Cajal
Madrid, 2009

En memoria de Andrés Valdelomar de Prado

Agradecimientos

En primer lugar me gustaría agradecer al Dr. Felipe Moreno, Jefe del Servicio de Genética Molecular, el haberme dado la oportunidad de entrar a formar parte de su equipo, ocupándose también de mi subvención, ya que si no hubiera sido así tal vez no estaría ahora redactando mi tesis doctoral.

Entrar en un laboratorio para formarte como investigador, es el comienzo para algún día alcanzar el grado de Doctor. Sin embargo, con el tiempo descubres que sin el guía apropiado puede que ese día no llegue nunca. Por eso me gustaría dar las gracias a la Dra. Concepción Hernández por la dirección de esta tesis, enseñándome no sólo biología molecular, sino a ser organizada, a saber escuchar (a veces me cuesta), a escribir de manera legible...y lo que es más importante, a pensar por mi misma que a fin de cuentas es la esencia de la investigación; gracias Concha. Y a la Dra. Manuela Villamar, también directora de esta tesis, que comenzó el estudio del PS realizando parte de la experimentación, por ayudarme a conseguir lo imposible...completar la clínica, por que sin ella no habría acabado nunca la escritura, y sobre todo por su amistad.

También me gustaría dar las gracias a todos los compañeros y amigos que han trabajado físicamente en esta tesis: Marta Gandía por su importante colaboración en el *screening* de los controles y por las risas con “DNAMAN”; Dr. Antonio Viñuela y Ana Valero por su inestimable ayuda con el genotipado de las familias.

Y por supuesto, a Dolores Tellería (Lolo) por que sin ella no tendría ni secuencias, ni haplotipos, ni resultados del DHPLC, ni ná de ná...además de tener la infinita paciencia de enseñarme el porqué de muchas cosas y, como no, por las risas y las charlas interminables; a la Dra. Yolanda Santodomingo (Yoli) por su ayuda cuando se encargaba del genotipador, por la ayuda con los SNaPshot y más cosas que seguro que me olvido; a la Dra. Carmen Valero por su valiosa ayuda con las RTs, los kits de extracción (DNA y RNA), la ayuda bioinformática, los consejos, etc.

A mis compañeras y amigas: Araceli por enseñarme gran parte de la experimentación, de la teoría, de los entresijos del laboratorio...por los “huevos poetas” y una infinidad de charlas vespertinas; Gemma (Gemmamari) por ser una gran amiga y estar tanto en los momentos buenos como en los más difíciles; Alba por organizar el laboratorio para que dejara de parecer una cueva, por sus consejos, por su ayuda con la redacción de la tesis, por las arepas y por muchas cosas más que podrían llenar muchos folios.

Así como a mis compañeros y amigos: Luix que compartió “exilio”...por echarme una mano siempre que se lo he pedido, por su amistad; Santos por prestarme, entre otras cosas, su termociclador; Javi por la ayuda informática siempre que la he necesitado. Gracias a los tres por las charlas y risas que amenizaron mis almuerzos, y por las cañitas del “Queen”.

Además, agradecer la colaboración del resto de doctores, predoctores y demás integrantes del equipo de sorderas: Ángeles, Carmen M., Elena, Fernando, Francisco, Gema, Ignacio, Marisol, Matías, Montse, Miguel Ángel, Silvia, etc. Así como al resto de compañeros de la Unidad que en algún momento me han echado una mano: Dani, Isabel, José Luis, Nati, Ros, Rosa, Toñi...

Grazie mille a mi colleghi di Milano: Dott. Paulmichl, Dott. Bottà, e come no Silvia, Simona e Anna Maria. The functional work and the PNAS paper could not have been possible without them. And grazie moltissimi, to the rest of the lab's girls (Valeria, Elisabetta, Claudia, Silvia...). Thank you all, for receiving me with open arms, for making me feel at home and for showing me Milano (specially "la Rinascente").

Gracias igualmente, a todos los médicos que han colaborado con el laboratorio enviándonos familias, especialmente la Dra. Carme Medà cuya colaboración ha sido clave para el desarrollo de esta tesis y las publicaciones que de ella han derivado.

Asimismo, quisiera expresar mi gratitud al Ministerio de Educación y Ciencia que me ha subvencionado durante el desarrollo de mi tesis doctoral, además de sufragar mi estancia en Italia.

También me gustaría dar las gracias a mi mentor, el Dr. Jose Ignacio Cubero, que me ayudó y guió al terminar la carrera y sin el cual no habría dado con el laboratorio del Dr. Moreno.

Muchas gracias a Kiko y Marta, testigos de mis comienzos, por todo lo que aprendí en micro con ellos, por las aventuras y desventuras con el termociclador, por los cigarrillos en las escaleras (aquellos tiempos en que fumaba...), por la esgrima, por las risas, por su amistad.

Y gracias también a mis actuales compañeros en inmuno (Inma, Juan, Laura, Mario y Silvia), por animarme a seguir cuando las cosas se torcían y las correcciones se alargaban. Y como no a los Dres. Jose Peña y Rafael Solana que me recibieron con los brazos abiertos, brindándome la oportunidad de formar parte de su laboratorio.

Antes de terminar me gustaría dar las gracias a las dos personas que más me han enseñado, mis padres. Por su cariño y confianza en mis posibilidades, por enseñarme a no tirar la toalla, por su imprescindible auxilio económico. Gracias a mi padre por tener la paciencia de ayudarme a mejorar la redacción de la tesis y, especialmente, a mi madre por cuidar de Claudia cuando yo no he podido.

Y como no, a mi marido Andrés, gracias por su amor, su infinita paciencia todos estos años de estudios interminables, por animarme cuando ya no quedaban ni lágrimas, por la sobrecarga de responsabilidad que han supuesto todos estos años de "prebecariedad", por alentarme incluso cuando esto suponía estar separados. En definitiva, gracias por permanecer a mi lado hasta el final.

En último lugar, aunque no en importancia, quisiera pedir perdón a mis hijos, Claudia y Carlos, por robarles momentos día a día...Y agradecerles sus sonrisas que siempre me han llenado de ánimo.

RESUMEN

El síndrome de Pendred (PS) y la sordera “EVA no sindrómica” están causados por mutaciones en el gen *SLC26A4*. Ambas patologías son recesivas, encontrándose en muchos casos un único alelo *SLC26A4* mutado o ninguno. En este trabajo se ha llevado a cabo el análisis mutacional del gen *SLC26A4* en 235 pacientes no relacionados con hipoacusia y 214 individuos normo-oyentes, españoles. Se identificaron 35 alelos mutados distintos, de los cuales 10 son nuevos. La mutación p.Q514K, es la más frecuente (16%; 6/37 variantes alélicas en afectados), el análisis de haplotipos mostró un efecto fundador en España. Además, se ha descrito la primera mutación *de novo* (p.Q413P) en el gen *SLC26A4*, en un paciente con PS; y se ha caracterizado por primera vez, los puntos de rotura de una delección multiexónica de 14 kb. Constatamos que los criterios utilizados para validar los cambios *missense* —conservación del residuo afectado en ortólogos *SLC26A4* e incidencia del cambio en población control—, son insuficientes. Realizamos un análisis funcional de 10 alelos *missense* identificados en la población sorda española. Este estudio demostró la naturaleza patogénica de 8 alelos y la naturaleza polimorfitica del cambio p.L597S, descrito previamente como patogénico. El análisis mutacional del gen *SLC26A4* en nuestros pacientes ha mostrado que la inactivación de ambos alelos de dicho gen es la causa de la mayoría de los casos PS. También la sordera “EVA no sindrómica” está causada por la inactivación de ambos alelos del gen *SLC26A4*, aunque la proporción de casos ligados a dicho gen es baja. Por otro lado, vemos que no existe correlación genotipo-fenotipo en dichas sorderas. En la muestra española, las sorderas *DFNB4* representan un 3% de los casos de hipoacusias autosómicas recesivas.

SUMMARY

Pendred's syndrome (PS) and “no-syndromic EVA” are caused by mutations in the *SLC26A4* gene. Both disorders are recessive, and yet only one mutated *SLC26A4* allele, or no mutation, is identified in many cases. We carry out the *SLC26A4* mutational analysis of 235 Spanish probands with hearing impairment and 214 normal-hearing individuals. We found 35 different mutated alleles, 10 of which are novel. The p.Q514K variant, was the most prevalent mutation (16%; 6/37 allelic variants in affected individuals), the haplotype analysis showed a founder effect in Spain. Furthermore, we describe for the first time a *de novo* mutation (p.Q413P) in *SLC26A4* gene, in a PS patient; and we characterized for the first time, the break points of a 14 kb multiexonic deletion. We confirmed the criteria used to validate missense mutations —low incidence of mutation in control population and substitution of evolutionary conserved amino acids—, are insufficient. We performed a functional assay of 10 missense alleles identified in the Spanish population. This analysis revealed the pathogenic nature of 8 alleles and the polymorphic nature of p.L597S variant, previously described as pathogenic. The mutational analysis of our patients showed that most of the PS cases are caused by biallelic inactivation of *SLC26A4* gene. Also, the “nonsyndromic EVA” deafness is caused by inactivation of both alleles of *SLC26A4* gene, although the proportion of cases linked to this gene is low. On the other hand, we have seen that there is not genotype-phenotype correlation. In the Spanish sample, *DFNB4* deafness stands for 3% of autosomic recessive hearing impairments.

INDICE

INTRODUCCION	1
1. Aspectos generales de las sorderas	3
1.1. Anatomía del oído humano	3
1.2. Fisiología de la audición	5
1.3. Clasificación de las hipoacusias	8
2. El síndrome de Pendred	8
2.1. Aspectos clínicos	8
2.2. Genética del síndrome de Pendred	11
3. Pendrina: miembro de la familia de transportadores SLC26 (SulP)	12
4. Modelos experimentales en ratón	17
OBJETIVOS	19
1. Análisis genético de las familias	21
2. Estudios funcionales de las mutaciones <i>missense</i>	21
3. Estudio de la relación genotipo-fenotipo en individuos portadores de mutaciones patogénicas del gen <i>SLC26A4</i> .	21
4. Estudio de la prevalencia de las sorderas PS/“EVA no sindromica”, en la población española.	21
PACIENTES Y METODOLOGIA	23
1. Pacientes y familias	25
2. Extracción de DNA genómico a partir de sangre	27
3. Extracción de DNA plasmídico	27
4. Estudio de polimorfismos de tipo microsatélite	27
4.1. Marcadores polimorfos ligados a <i>DFNB4</i>	27
4.2. Estudio de paternidad	28
5. Análisis mutacional	29
5.1. Análisis mutacional del gen <i>SLC26A4</i>	29
5.1.1. Análisis mutacional mediante heterodúplex	29
5.1.2. Análisis mediante DGGE	30
5.1.3. Análisis mediante DHPLC	30
5.1.4. Secuenciación	30
5.1.5. Detección de mutaciones mediante SNaPshot	33
5.2. Análisis mutacional del gen <i>FOXI1</i>	34
6. Caracterización de la delección intragénica del gen <i>SLC26A4</i> (g.8091T_22145Cdel)	35

7. Clonaje de la mutación de <i>novo</i>	37
8. Test diagnósticos para la detección de mutaciones en el gen <i>SLC26A4</i>	38
8.1. Detección de la variante alélica p.V88I	38
8.2. Detección de la variante alélica p.Q413P	38
8.3. Detección de la variante alélica p.D724G	38
9. Mutagénesis dirigida	38
10. Cultivo celular y transfección transitoria	40
11. Análisis funcionales (Mediciones de Fluorescencia)	40
12. Análisis <i>in silico</i>	41

RESULTADOS 43

1. Análisis de ligamiento al locus <i>DFNB4</i>	45
2. Detección de mutaciones en el gen <i>SLC26A4</i>	47
3. Espectro mutacional del gen <i>SLC26A4</i> en la población sorda española	49
3.1. Mutaciones puntuales	50
3.2. Mutaciones puntuales en secuencia no codificante	50
3.3. Caracterización de la mutación <i>de novo</i> p.Q413P	52
3.4. Estudio del origen evolutivo de la mutación p.Q514K	54
3.5. Deleción intragénica	55
4. Variantes alélicas del gen <i>SLC26A4</i> en individuos normo-oyentes	61
5. Validación de los cambios puntuales identificados en el gen <i>SLC26A4</i>	62
5.1. Mutaciones <i>missense</i>	62
5.2. Mutaciones que alteran el procesamiento del mRNA	64
5.3. Mutaciones que alteran la fase de lectura	65
6. Análisis mutacional del gen <i>FOXII</i>	65
7. Estudio funcional de cambios <i>missense</i> del gen <i>SLC26A4</i>	65
8. Análisis de la relación genotipo-fenotipo en pacientes con mutaciones en el gen <i>SLC26A4</i>	68

DISCUSION 74

1. Espectro mutacional del gen <i>SLC26A4</i> en la población española	75
1.1. Naturaleza patogénica de los cambios <i>missense</i> : análisis funcional	77
1.2. Caracterización de la mutación <i>de novo</i>	83
1.3. Caracterización de la deleción g.80917_22145Cdel	84

1.4. Comparación del espectro mutacional del gen <i>SLC26A4</i> en las distintas poblaciones	85
2. Causas genéticas del síndrome de Pedred y la sordera “EVA no sindrómica”	86
3. Prevalencia de las sorderas PS/“EVA no sindrómica” en la población española	89
CONCLUSIONES	91
BIBLIOGRAFIA	95
APENDICE I	113
APENDICE II	136

CLAVE DE ABREVIATURAS

aa	aminoácido
A _{260/280}	absorbancia a 260 nm / absorbancia a 280 nm
cDNA	DNA copia
AMPc	AMP cíclico
mRNA	RNA mensajero
ASA	antagonista del factor antisigma
°C	grados centígrados
Ca ⁺	ión calcio
CCE	células ciliadas externas
CCI	células ciliadas internas
Cen	centrómero
Cl ⁻	ión cloruro
DFNB	<i>locus</i> de sordera no sindrómica de herencia autosómica recesiva
dNTP	desoxinucleótido trifosfato
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EVA	acueducto vestibular dilatado
FAM	6-carboxifluoresceína
HCO ₃ ⁻	ión bicarbonato
HEPES	4-(2-hidroxietil)-1-ácido piperazineetanesulfónico
HEX	hexacloro-6-carboxifluoresceína
I ⁻	ión yoduro
K ⁺	ión potasio
kb	kilo bases
KD	kilo dalton
LB	medio Luria-Bertani
LOH	pérdida de heterozigosidad (<i>Loss of Heterozigosity</i>)
M	molar
MgCl ₂	cloruro magnésico
min	minutos
mm	milímetros
mM	milimolar
μl	microlitros

μM	micromolar
mV	milivoltios
Na^+	ión sodio
NCBI	<i>National center for biotechnology information</i>
ng	nanogramos
nm	nanometros
nmoles	nanomoles
OH^-	ión hidroxilo
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
pmoles	pico moles
PS	síndrome de Pendred
RT	transcripción transversa
s	segundos
SO_4^{2-}	ión sulfato
SNP	polimorfismo de un solo nucleótido (<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)
STR	polimorfismo de repeticiones cortas en tándem (<i>Short Tandem Repeats</i>)
T3	triyodotironina
T4	tiroxina
Ta	temperatura de hibridación
TAC	tomografía axial computerizada
TC	tomografía computerizada
Tel	telómero
TET	tetracloro-6-carboxifluoresceína
TG	tiroglobulina
TPO	tiroperoxidasa
TSH	hormona estimulante del tiroides
U	unidad de enzima
V	voltios
WT	silvestre (<i>Wild Type</i>)
Ø	diámetro

INTRODUCCION

1. ASPECTOS GENERALES DE LAS SORDERAS

Actualmente, en los países desarrollados, uno de cada 1000 niños está afectado de sordera en el nacimiento o durante la infancia temprana, es decir, el periodo prelocutivo. Se estima que el 60% de las hipoacusias son hereditarias, siendo el 40% restante de origen ambiental (infecciones bacterianas y virales, tratamiento con fármacos ototóxicos y trauma acústico). Las hipoacusias hereditarias tienen una alta heterogeneidad genética, estimándose que existen más de 100 genes responsables de esta enfermedad (Petit et al., 2006). La causa de esta elevada heterogeneidad es, probablemente, el reflejo de la gran complejidad estructural y funcional del oído humano.

1.1. Anatomía del oído humano

El sistema auditivo está compuesto por tres compartimentos (Figura 1A): el **oído externo** que integra el pabellón auditivo y el conducto auditivo externo, el **oído medio** que se compone de la membrana timpánica y la cadena de huesecillos (martillo, yunque y estribo) y el **oído interno** constituido por el sistema vestibular y la cóclea. El oído interno se comunica con el oído medio a través de la ventana oval en la cual se inserta la base del estribo, y la ventana redonda, cerrada por la membrana timpánica secundaria (Figura 1A y B).

En el oído interno, el sistema vestibular está encargado del equilibrio; mientras que la cóclea, responsable de la audición, transforma los estímulos mecánicos en impulsos nerviosos. Ambos sistemas se alojan en el hueso temporal y están formados por un conjunto de conductos y cavidades conectados entre sí que constituyen el laberinto membranoso, por cuyo interior circula la endolinfa. A su vez, el laberinto membranoso se halla sumergido en la perilinfa dentro del laberinto óseo. El vestíbulo se compone de sáculo, utrículo y tres canales semicirculares (Figura 1A). El utrículo se conecta con los tres conductos semicirculares, los cuales en una de sus inserciones tienen una dilatación denominada ampolla o ámpula. En esta última se alojan las terminaciones del nervio vestibular que se originan en las crestas acústicas de las ampollas. En la unión entre el utrículo y el sáculo está el canal o conducto endolinfático que termina en el saco endolinfático (Figura 1B). Este canal membranoso se aloja en un conducto óseo, llamado acueducto vestibular, que se extiende desde la pared medial de la cavidad del vestíbulo hasta la superficie endocraneal de la cara poserosuperior del peñasco. El canal y saco endolinfáticos están rellenos de endolinfa que fluye desde los órganos del oído interno hacia el saco endolinfático. La cóclea es una estructura ósea

con forma de caracol que contiene el órgano sensorial de la audición. Posee una longitud de unos 3 cm y se enrolla sobre sí misma describiendo dos vueltas y media en torno a un eje central, el modíolo. En su interior posee tres canales membranosos: la escala vestibular, la escala timpánica y la escala media o conducto coclear (Figura 2). La escala vestibular y la escala timpánica están llenas de perilinfa y se comunican en la parte apical del laberinto óseo mediante una abertura denominada helicotrema. El conducto coclear, lleno de endolinfa, se separa de la escala vestibular por la membrana de Reissner, y de la escala timpánica, por la membrana basilar. La escala vestibular comunica, en la zona basal, con la ventana oval, mientras que la escala timpánica termina en la ventana redonda. La endolinfa secretada por la estría vascular de la pared lateral del conducto coclear, tiene una composición iónica similar a la del fluido intracelular, por lo tanto, rica en K^+ y HCO_3^- y baja en Na^+ y Ca^{2+} ; mientras que la perilinfa es similar al líquido extracelular, rica en Na^+ y baja en K^+ . Esta diferente composición iónica crea una diferencia de potencial entre ambos fluidos, de aproximadamente +80mV, denominado potencial endococlear.

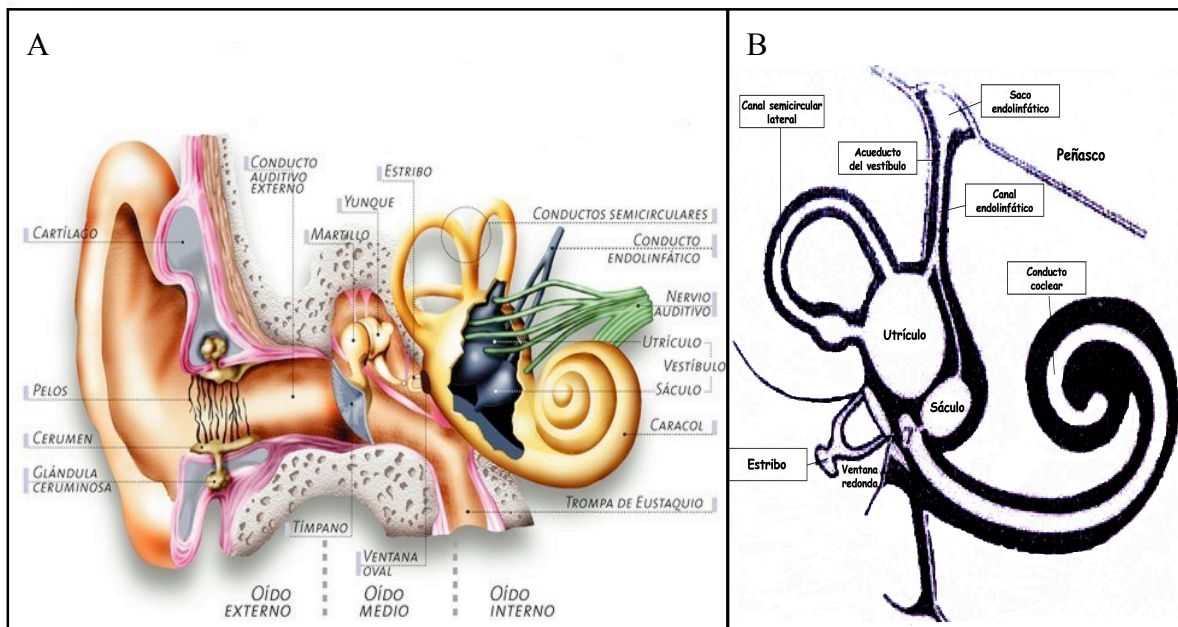


Figura 1. A) Esquema del sistema auditivo (adaptado de http://usuarios.discapnet.es/ojo_oido/index.htm). B) Corte del oído interno mostrando el sistema vestibular y la cóclea (adaptado de http://alfinal.com/orl/anatomiadel_oido.shtml).

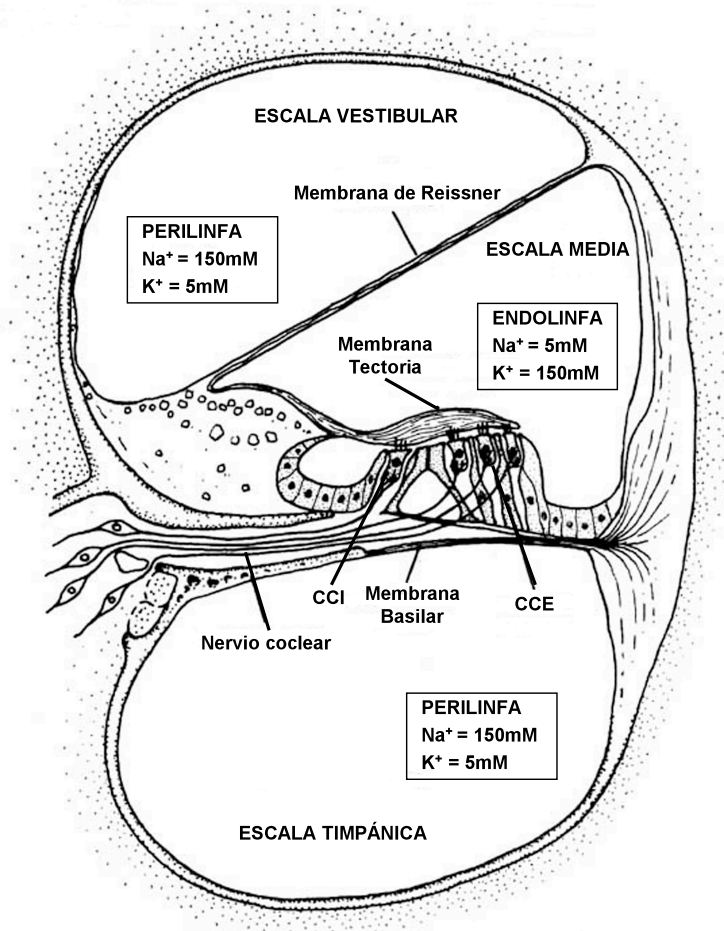


Figura 2. Corte transversal de la cóclea en el que se pueden observar sus distintos canales, la composición de la endolinfa, perilinfa y el órgano de Corti; CCI: células ciliadas internas; CCE: células ciliadas externas (adaptado de <http://www.eumus.edu.uy/docentes/maggiolo/acuapu/sap.html&h>).

1.2. Fisiología de la audición

Cuando el sonido llega al oído, las ondas sonoras son recogidas por el pabellón auricular (o aurícula). El pabellón auricular, por su forma helicoidal, funciona como una especie de "embudo" dirigiendo el sonido hacia el interior del oído. Una vez que el sonido ha sido recogido, las vibraciones provocadas por la variación de presión del aire cruzan el canal auditivo externo y llegan a la membrana timpánica en el oído medio. Aquí se produce la transformación de la energía acústica (ondas sonoras en medio aéreo) en energía mecánica (ondas sonoras en medio sólido). La presión de las ondas sonoras hace que el tímpano vibre empujando a los osículos, que a su vez, transmiten el movimiento del tímpano al oído interno a través de la ventana oval. En el oído medio, la señal es amplificada alrededor de 20 veces debido a la diferencia de tamaño existente entre el tímpano y la ventana oval. La presión ejercida sobre esta última se transmite al interior de la cóclea poniendo en movimiento la perilinfa que transfiere las vibraciones a

la membrana basilar. Puesto que tanto los fluidos como las paredes de la cóclea no se comprimen, es preciso compensar el desplazamiento de los fluidos, esto se lleva a cabo en la membrana de la ventana redonda, (Figura 1A y B).

Sobre la membrana basilar descansa el órgano sensorial auditivo u **órgano de Corti** formado por células ciliadas y células de soporte (Figura 2). Las células ciliadas son los receptores sensoriales auditivos. Existen dos tipos: las células ciliadas internas (CCIs) que se disponen en una hilera y las células ciliadas externas (CCEs) dispuestas en tres hileras, discurriendo ambas longitudinalmente a lo largo de la cóclea (Figura 3A). Los dos tipos celulares presentan en su parte apical un penacho de *microvilli* rígidos denominados estereocilios. Estas estructuras poseen un esqueleto molecular de filamentos de actina y miosina. Los estereocilios están conectados entre sí mediante unas fibrillas denominadas uniones apicales (*tip-links*) (Figura 3B). Las puntas más altas de los estereocilios de las CCEs están en contacto con la membrana tectoria. Las CCIs son las células sensoriales primarias, en su base se sitúa la entrada sináptica de las neuronas aferentes. Las CCEs tienen invervación aferente y eferente, y su función principal es contribuir a la resolución y amplificación de la frecuencia a través de su actividad motora, modulando la función de las CCIs.

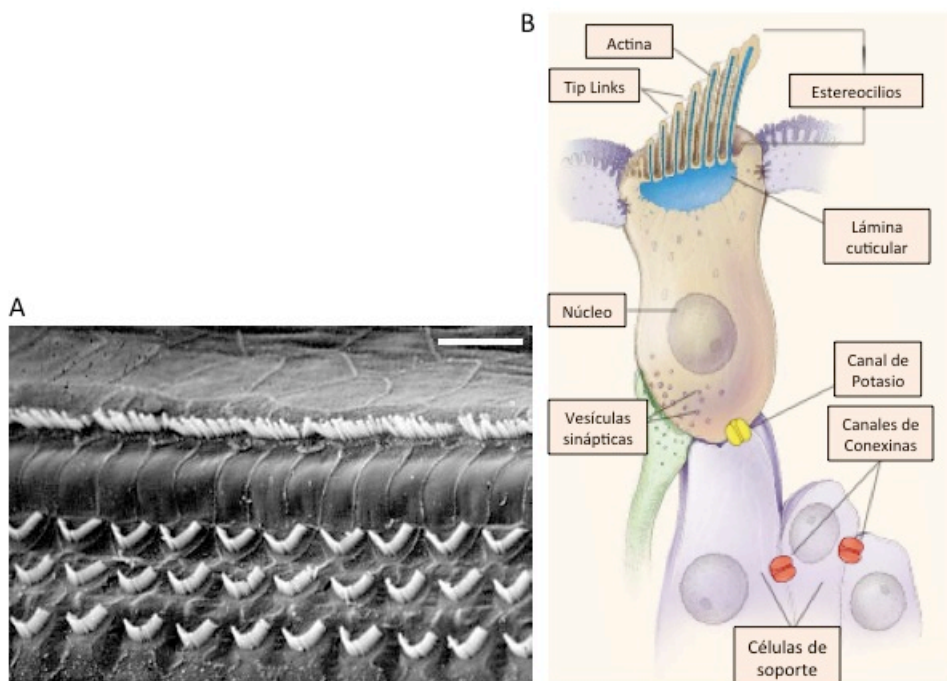


Figura 3. A) Micrografía electrónica de barrido en la que se observa la superficie de la lámina reticular con los estereocilios de las CCIs formando una hilera (arriba) y los de las CCEs formando tres hileras (abajo), (fotografía de M. Lenoir, CRIC; URL: <http://www.cochlea.org>). B) Célula ciliada externa del órgano de Corti; en amarillo canales de K^+ formados por KCNQ4; en rojo canales de K^+ formados por conexinas (adaptado de Willems 2000).

Las ondas de compresión en la perilinfa mueven la membrana basilar que induce el desplazamiento de las CCEs y su acercamiento a la membrana tectoria. Dicho acercamiento provoca la inclinación del penacho de estereocilios y abre los canales de K^+ situados en su membrana. Debido a la diferencia de potencial entre la endolinfa y el citoplasma de las células ciliadas en reposo, la apertura de los canales genera un flujo de iones K^+ a favor del gradiente electroquímico, hacia el interior de las CCEs, produciendo su despolarización. Esta despolarización de las células ciliadas activa los canales de Ca^{2+} . La entrada del calcio provoca la salida de los neurotransmisores (glutamato) y la activación de la respuesta neuronal. Para mantener una audición normal es necesario que los iones K^+ sean reciclados. Después de la entrada y el inicio del potencial de acción, los iones K^+ pasan a través de canales basolaterales (canales KCNQ4) de la célula ciliada a las células de soporte. Desde éstas, los iones difunden pasivamente de célula a célula a través de uniones estrechas —*gap junctions*— formadas por conexinas (Willems et al, 2000). Cuando el K^+ alcanza las células intermedias de la estría vascular, es bombeado hacia el espacio intercelular, mediante canales KCNJ10, para generar el potencial endococlear. Después, el K^+ es transportado a las células marginales de la estría vascular mediante el cotransportador $Na^+/2Cl^-/K^+$ (SLC12A2), y la Na^+/K^+ -ATPasa (ATP1A1/ATP1B2) situados en la membrana basolateral de estas células. Por último, el K^+ es bombeado de nuevo a la endolinfa gracias a canales KCNQ1/KCNE1 situados en la membrana apical de las células marginales de la estría vascular (Wangemann, 2002), (Figura 4).

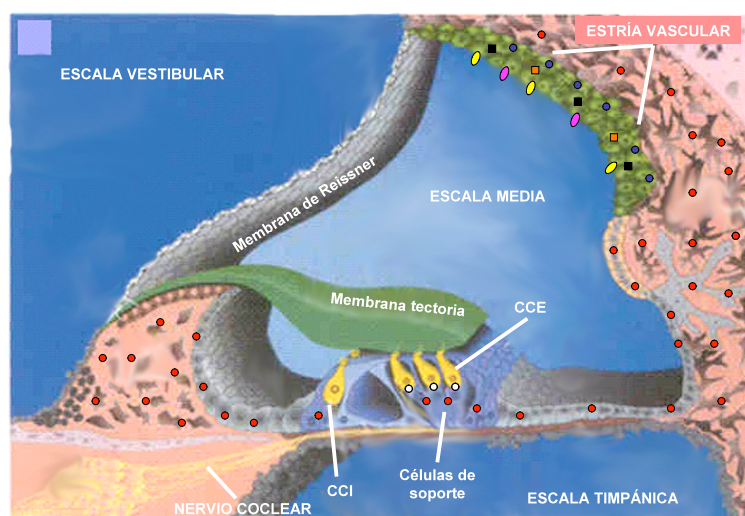


Figura 4. Corte transversal de la cóclea en el que se observa el órgano de Corti y los canales implicados en el transporte de K^+ . En blanco, canales KCNQ4; en rojo, uniones estrechas formadas por conexinas; en azul canales KCNJ10; en negro SLC12A2; en naranja, ATP1A1/ATP1B2; en amarillo, canales KCNQ1 y en rosa, canales KCNE1.

1.3. Clasificación de las hipoacusias

La pérdida auditiva se clasifica según la **gravedad** en: leve (pérdidas de 21-40dB), moderada (pérdidas de 41-70dB), grave (pérdidas de 71-95 dB) y profunda (pérdidas mayores de 95dB). También se puede clasificar en base a la **localización del defecto** en: conductivas debidas a defectos en el oído externo y medio, neurosensoriales debidas en su mayoría a defectos en el oído interno y mixtas cuando está implicado tanto el oído medio como el interno (Petit et al, 2001). Según el **tipo de herencia** las hipoacusias pueden ser: autosómicas dominantes (DFNA, 10-20%), autosómicas recesivas (DFNB, 70-80%), ligadas al cromosoma X (DFN, 1-2%) o mitocondriales (0-20%). Con respecto al **fenotipo**: el 70% de las sorderas son no sindrómicas, es decir, la pérdida auditiva es el único signo clínico; mientras que el 30% restante son sindrómicas. En estos casos la hipoacusia se presenta asociada a una serie de síntomas y signos que definen un síndrome. Se han descrito más de 300 síndromes que asocian la sordera a otros desórdenes de los sistemas cardiovascular, urogenital, nervioso, endocrino, digestivo, etc. Hasta la fecha se han descrito al menos 38 genes que serían responsables de algunos de esos síndromes (Morton, 2002).

2. EL SÍNDROME DE PENDRED

El síndrome de Pendred (PS) fue descrito por primera vez en 1896 por Vaughan Pendred, un médico británico que describió en dos hermanos de origen irlandés la asociación de una sordera congénita y bocio no imputable a causas medioambientales (Pendred, 1896). Hoy en día, el síndrome de Pendred (MIM 274600) se considera la sordera congénita sindrómica más común, con una incidencia estimada de 7-10 sordos de cada 100,000 nacidos (Fraser, 1965).

2.1. Aspectos clínicos

Las características clínicas del PS incluyen: sordera neurosensorial prelocutiva (0-5 años) o perilocutiva (5-7 años). La pérdida auditiva suele progresar desde hipoacusias moderadas a profundas. También se dan casos de pérdida repentina de la audición después de un traumatismo craneal, un esfuerzo intenso, o un cambio brusco de presión barométrica. En ocasiones la sordera es fluctuante y puede asociarse con alteraciones del equilibrio. La hipoacusia se acompaña de problemas tiroideos con aparición de bocio, generalmente eutiroideo, en aproximadamente un tercio de los pacientes, que suele presentarse en la segunda década de la vida.

La glándula tiroidea está compuesta por numerosas unidades funcionales denominadas folículos. Cada folículo está recubierto por células epiteliales — tirocitos— que rodean el espacio que contiene el coloide (lumen coloidal). El polo apical del tirocito conecta con el lumen, el polo basal se encuentra próximo a los capilares. El tiroides permite el almacenamiento extracelular de las hormonas T3 (triyodotironina) y T4 (tiroxina) en el lumen coloidal. Ambas hormonas se almacenan como constituyentes de una glucoproteína llamada tiroglobulina (TG). La producción y secreción de las hormonas tiroideas (T3 y T4) está estimulada por la hormona hipofisaria TSH (hormona estimulante del tiroides), mediante su interacción con un receptor específico en la superficie de los tirocitos que induce un aumento de la síntesis de cAMP, un aumento de la captación de yodo y la síntesis hormonal. Los procesos de síntesis y secreción de TSH a su vez, están regulados por la concentración de hormonas T3 y T4. Las modificaciones de forma y tamaño de la glándula —bocio nodular o difuso— no necesariamente se asocian con alteraciones de la función.

El yodo, esencial para la producción de hormonas tiroideas, es transportado al interior del tirocito en contra del gradiente electroquímico, mediante el cotransportador de Na^+/I^- (NIS) (Smanik et al, 1996) situado en la membrana basolateral del tirocito, y desde el citoplasma a la luz del folículo, por diversos transportadores entre los que se encuentra la pendrina. En el lumen, el I^- es oxidado por la enzima tiroperoxidasa (TPO) que cataliza su unión a los residuos de tirosina en la molécula de TG, en un proceso denominado organificación del yodo (Figura 5).

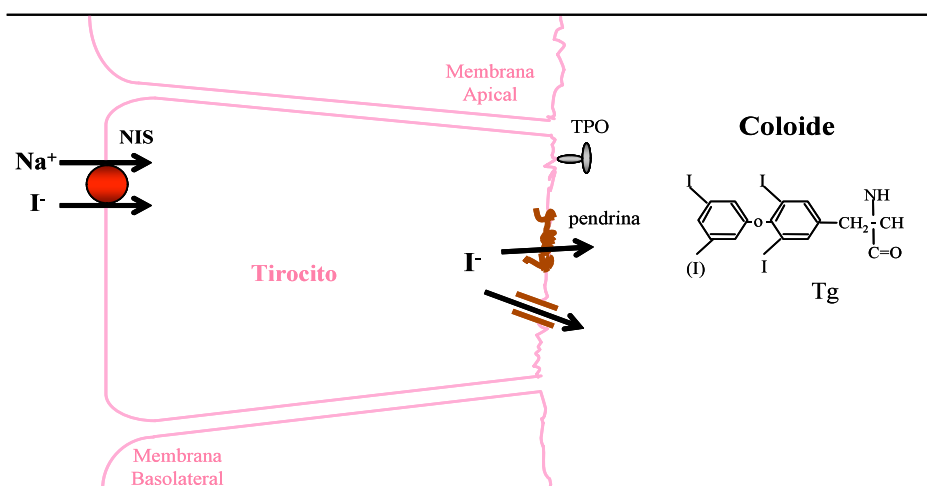


Figura 5. Transporte de yodo en la célula tiroidea.

El defecto tiroideo en el PS es debido a la alteración del transporte de I^- , que puede valorarse mediante el test de la descarga del perclorato (Brain, 1927; Morgans et al, 1958). Para ello se administra a los pacientes I^- radiactivo, transcurridas dos horas, se determina la cantidad de I^- retenido en el tiroides, y seguidamente se les suministra una solución oral de perclorato sódico. El perclorato bloquea a NIS, y por tanto la entrada de I^- en el tirocito. Una hora después se vuelve a determinar la captación tiroidea (cantidad de I^- retenido en el tiroides), que en individuos sanos será prácticamente la misma que la obtenida anteriormente (cercana al 100%). Sin embargo, en los individuos con alteración en la organificación del I^- , el ión no es retenido en la glándula y parte de él escapa al torrente sanguíneo. Se consideran valores patológicos (descarga positiva) los que muestran una reducción de la captación superior al 10%. Los valores de la descarga se expresan en %, relativos al valor de captación inicial medido dos horas después de la administración del I^- . Pacientes con hipotiroidismo congénito debido a defectos en la TPO, con enfermedad de Hashimoto, con enfermedad de Grave hipertiroidea, o PS, entre otros, presentan test de perclorato positivo (Roti et al., 1994).

El desarrollo de las técnicas radiodiagnósticas, permitieron observar en pacientes con PS ciertas malformaciones del oído interno, tales como: la dilatación del acueducto vestibular (EVA) —incluidos el canal y saco endolinfáticos— y la displasia de la cóclea (malformación de Mondini), (Hvidberg-Hansen et al, 1968). Los estudios posteriores demostraron que el EVA está presente en la mayoría de estos pacientes y en menor proporción la malformación de Mondini (Andersen, 1974; Phelps et al, 1998). El EVA es el hallazgo clínico más frecuente del oído interno en las hipoacusias neurosensoriales infantiles. En esta malformación el canal y el saco endolinfáticos son mucho mayores de lo normal, alcanzando el acueducto un diámetro superior a 1,5mm (Valvassori et al, 1978). En la malformación de Mondini, la cóclea es hipoplásica carente de la espira basal completa, mostrando así un acortamiento del modiolos. Este tipo de malformación no es exclusivo de pacientes con PS, pudiendo presentarse como rasgo secundario acompañante de otros muchos síndromes, como el síndrome de BOR (síndrome braquio-otorrenal). En el síndrome de Pendred, la malformación de Mondini siempre se presenta acompañada de EVA.

En la actualidad el PS se caracteriza por una tríada de signos y síntomas: sordera neurosensorial, malformaciones del oído interno (EVA con o sin malformación de Mondini), y la alteración del proceso de mineralización del tiroides (con o sin bocio) con test de descarga del perclorato positivo (Reardon et al., 2000).

2.2. Genética del síndrome de Pendred

Su patrón de herencia es autosómico recesivo y está causado por mutaciones en el gen *SLC26A4* (*PDS*) localizado en el cromosoma 7q31. El gen *SLC26A4* fue identificado mediante clonaje posicional por Everett et al. (1997). Este gen comprende 57.175 pb de DNA genómico (NT_007933) y codifica un transcrito de 4.930 pb (NM_000441), (Figura 6). La secuencia codificante del gen (2.343 pb) comprende los exones 2 al 21. La proteína que codifica dicho gen, Pendrina (NP_000432) de 780 aminoácidos (86 KD), es miembro de la familia de transportadores de aniones SLC26A (*solute carrier family 26, multifunctional anion exchanger family*) (Scott et al, 1999; Lohi et al, 2000). Hasta la fecha no se han descrito isoformas de esta proteína.

El transcrito del gen *SLC26A4* se expresa principalmente en tiroides (Royaux et al, 2000; Bidart et al, 2000a) y en menor medida en riñón (Royaux et al, 2001), placenta (Bidart et al, 2000b), endometrio (Suzuki et al, 2002) y testículos (Lacroix et al, 2001). En el ratón, *Mus musculus*, se ha encontrado expresión del gen ortólogo (*Slc26a4*) en el vestíbulo y en la cóclea, en regiones importantes para la reabsorción del fluido endolinfático (Everett et al, 1999).

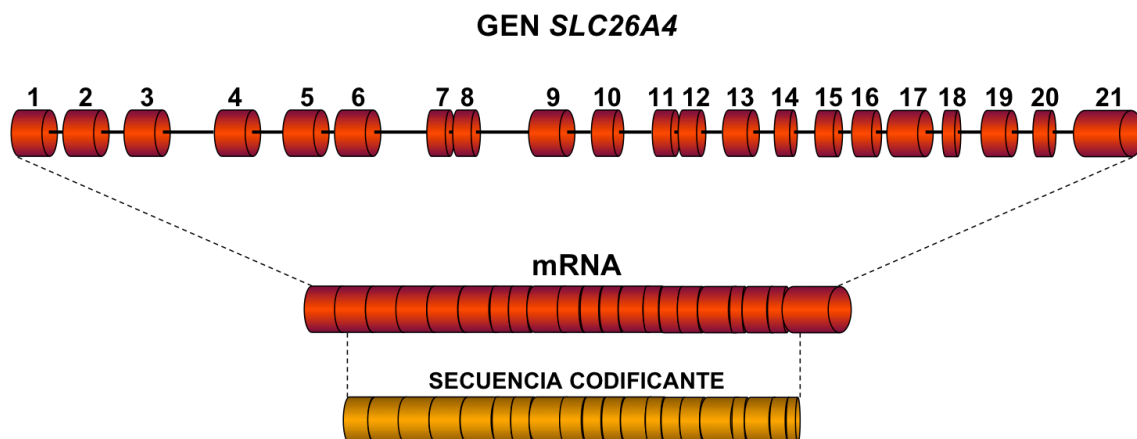


Figura 6. Estructura exón-intrón del gen *SLC26A4* mostrando el procesamiento del mRNA (*splicing*). En naranja, secuencia codificante del gen que comienza a partir de la cuarta base del exón 2 (primera base del codón inicio, *ATG*) hasta la vigésima cuarta base del exón 21 (última base del codón parada, *TGA*). El exón 1, las tres primeras bases del exón 2 y casi todo el exón 21 (2.366 pb), no son codificantes y por tanto no se traducen.

Antes de la identificación del gen *SLC26A4*, Baldwin et al., demostraron ligamiento de una hipoacusia recesiva no sindrómica a la región cromosómica 7q31 (locus *DFNB4*) (Baldwin et al., 1995). Este resultado les llevó a definir la sordera no sindrómica *DFNB4* (MIM 600791). Más tarde, sin embargo, se demostró que algunos de los pacientes desarrollaron bocio y por tanto estaban afectados de síndrome de Pendred. Pese a ello, después de la descripción del gen *SLC26A4*, otros estudios mostraron nuevos pacientes con sordera asociada a EVA sin alteración del tiroides — “EVA no sindrómica” (MIM 600791) —, causada por mutaciones en el gen *SLC26A4* (Li et al., 1998; Usami et al., 1999).

El análisis mutacional del gen *SLC26A4* en familias de diferentes grupos poblacionales, ha mostrado una gran heterogeneidad alélica. Habitualmente los cambios, mayoritariamente del tipo *missense*, han sido descritos en una única familia. No obstante, algunas mutaciones son recurrentes y han sido identificadas en varias poblaciones (Coyle et al, 1998; van Hauwe et al., 1998; Campbell et al., 2001; Park et al., 2003).

Un hecho importante es la alta frecuencia de individuos con PS y sordera “EVA no sindrómica” que carecen de mutaciones en el gen *SLC26A4* en uno o ambos alelos, indicando la existencia de otros factores genéticos y/o ambientales que comportan dichos fenotipos.

Mediante análisis de ligamiento se han detectado otros dos loci de hipoacusias no sindrómicas —*DFNB14* y *DFNB17*—, en la misma región cromosómica 7q31, próximos al gen *SLC26A4* (Greinwald et al., 1998; Mustapha et al., 1998).

3. LA PENDRINA: MIEMBRO DE LA FAMILIA SLC26 (SulP)

La familia de transportadores SLC26 forma parte de la superfamilia SulP o “Sulfato Permeasa”, constituida por un gran número de transportadores de sulfato de diferentes organismos: bacterias, plantas (Hawkesford, 2003), hongos (Cherest et al, 1997) y mamíferos (Saier et al, 1999). El producto del gen *SLC26A4* (pendrina) es un miembro de dicha familia de transportadores.

En la actualidad se conocen 10 genes humanos y un pseudogen pertenecientes a la familia SLC26, tres de los cuales están asociados a enfermedades genéticas: *SLC26A2* (condrodisplasias), *SLC26A3* (diarrea congénita de cloro) y *SLC26A4* (síndrome de Pendred y sordera no sindrómica *DFNB4*) (Tabla 1). Los transportadores SLC26 son capaces de intercambiar diferentes aniones: cloruro, yoduro, sulfato, bicarbonato,

hidroxilo, oxalato y formato. Al igual que el resto de miembros de la superfamilia SulP, los transportadores SLC26 humanos —excepto la Pendrina y la Prestina (proteína motora coclear) — transportan sulfato, aunque el transporte de este anión no siempre parece ser su función principal.

Hasta la fecha, ninguno de los 10 miembros de la familia SLC26 ha sido cristalizado, no obstante de su secuencia aminoacídica se deduce que son proteínas altamente hidrófobas. La predicción de los análisis *in silico* para las proteínas SLC26 muestra la existencia de 10 a 14 dominios transmembrana en la parte media de la secuencia aminoacídica y de regiones amino y carboxilo terminal citosólicas (Byeon et al., 1996; Saier et al., 1999). La mayor homología de secuencia de los transportadores SLC26 reside en la región de dominios transmembrana. El dominio STAS localizado en la región carboxilo terminal es de longitud variable y está menos conservado. En el caso de la Pendrina el 57% de los residuos son hidrofóbicos, para los que se predice una organización en 12 dominios transmembrana. Dichos dominios comienzan en el aminoácido 88 y terminan en el 503. El segundo dominio transmembrana contiene una secuencia muy conservada en todos los miembros de la superfamilia SulP, denominada “*sulfate transporter signature*” que se extiende desde el residuo 113 al 134. El extremo carboxilo terminal contiene al dominio STAS que comienza en el amino ácido 535 y termina en el 729.

Tabla 1. Características de los transportadores humanos pertenecientes a la familia SLC26.

Gen	Localización cromosómica	Sitios de expresión mayoritarios	Enfermedad	Transporte
<i>SLC26A1 (SATI)</i>	4p16.3	Riñón, hígado	No se conoce	SO ₄ ²⁻ , Oxalato
<i>SLC26A2 (DTDST)</i>	5q32-33.1	Ubicua	DTD, ACGIB, AOII	SO ₄ ²⁻ , Cl ⁻
<i>SLC26A3 (CLD, DRA)</i>	7q31.1	Ileon, colon, vesícula seminal, glándula sudorípara ecrina	Diarrea congénita de cloro	SO ₄ ²⁻ , Cl ⁻ , HCO ₃ ⁻ , OH ⁻ , Oxalato
<i>SLC26A4 (PDS)</i>	7q31.1	Oído interno, riñón, tiroides	PS, EVA/DFNB4	Cl ⁻ , I ⁻ , HCO ₃ ⁻ , Formato
<i>SLC26A5 (PRES)</i>	7q22.1	CCEs	¿DFNB61?	Proteína motora
<i>SLC26A6 (CEFEX, PAT-1)</i>	3q21.3	Riñón, páncreas	No se conoce	SO ₄ ²⁻ , Cl ⁻ , HCO ₃ ⁻ , OH ⁻ , Oxalato, Formato
<i>SLC26A7</i>	8q22.2	Riñón	No se conoce	Cl ⁻ , SO ₄ ²⁻ , Oxalato
<i>SLC26A8 (TAT 1)</i>	6p21.3	Testículo, cerebro	No se conoce	Cl ⁻ , SO ₄ ²⁻ , Oxalato
<i>SLC26A9</i>	1q32	Pulmón	No se conoce	Cl ⁻ , SO ₄ ²⁻ , Oxalato
<i>SLC26A10*</i>	12q13			
<i>SLC26A11</i>	17q25	Ubicua	No se conoce	SO ₄ ²⁻

La numeración (1-11) de los genes se corresponde con el orden en que han sido descritos. * Pseudogen. CCEs; células ciliadas externas (oído interno). DTD (MIM 222600), ACGIB (MIM 600972), AOII (MIM 256050), Diarrea Congénita de Cloro (MIM 214700), PS (MIM 274600), EVA/DFNB4 (MIM 600791), DFNB61; sordera neurosensorial autosómica recesiva 61.

La región que engloba los dominios transmembrana de las proteínas SLC26, constituye la **región catalítica**. Mutaciones en secuencias conservadas de esta región altera la funcionalidad de los transportadores SLC26 (Khurana et al., 2000; Karniski, 2001). Sin embargo, no existen estudios más profundos referentes a la implicación de dicha región en el transporte de aniones.

El dominio STAS (*sulfate transporters and antisigma-factor antagonists*) que comprende entre 100 y 200 aminoácidos está conservado evolutivamente. Este dominio fue definido en base a la homología de secuencia existente entre la región carboxilo terminal de los transportadores SulP y el antagonista del factor anti-sigma (ASA) SpoIIAA de *Bacillus subtilis* (Aravind et al, 2000). Las proteínas ASA bacterianas, como SpoIIAA, interactúan con los factores de transcripción sigma mediante su interacción con factores anti-sigma. Estos últimos, además de inhibir la transcripción mediada por los factores sigma, actúan como proteínas quinasas inactivando ASA mediante la fosforilación de un residuo serina del lazo conservado, que puede ser reactivado mediante la desfosforilación de dicho residuo (Figura 8). La comparación de las secuencias de SpoIIAA y los dominios STAS de diferentes proteínas muestra la existencia de regiones muy conservadas y otras más variables, donde ocurren inserciones que pueden ser de más de 100 aminoácidos en algunos transportadores SLC26 (Figura 8). Precisamente, algunas de las características específicas de estos transportadores parecen estar relacionadas con dicho dominio STAS.

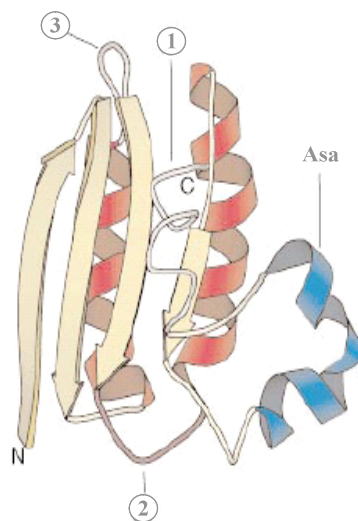


Figura 8. Características estructurales del dominio STAS, generado a partir de la estructura de SpoIIAA. En azul se denota el asa de α -hélice. (1) Hélice carboxilo terminal poco conservada; (2) lazo conservado implicado en la unión a nucleótidos; (3) lazo variable donde ocurren grandes inserciones en los transportadores de aniones; N, extremo amino terminal; C, extremo carboxilo terminal. (Adaptado de Aravind et al, 2000).

Aunque el funcionamiento de SpoIIAA está bien descrito, se conoce muy poco del papel fisiológico y/o funcional del dominio STAS en los transportadores SLC26. No obstante, algunos estudios funcionales en los que se ha alterado o eliminado dicho dominio, subrayan su importancia para la función transportadora (Chernova et al, 2003; Shibagaki et al, 2004).

Mediante estudios funcionales *in vivo* se han caracterizado una veintena de mutaciones localizadas a lo largo de la secuencia codificante del gen *SLC26A4*. En la mayoría de las proteínas mutantes ensayadas, se observó una pérdida de la función transportadora debido a que los mutantes no alcanzaban la membrana plasmática, quedando retenidos en el retículo endoplasmático (RE), (Taylor et al, 2002; Rotman-Pikielny et al, 2002; Yoon et al., 2008).

Mediante estudios inmunohistoquímicos se ha determinado la localización de la proteína Pendrina en diferentes órganos y tejidos. Se ha encontrado esta proteína en la membrana del polo apical de los tirocitos humanos y de rata, tapizando el lumen folicular tiroideo (Royaux et al., 2000; Bidart et al., 2000a). También se ha detectado Pendrina en la membrana apical de las células intercaladas del conducto cortical colector (CCD) del riñón (Royaux et al., 2001; Lacroix et al., 2001), en el borde en cepillo de las células sincitiotrofoblásticas de la placenta (Bidart et al., 2000b), específicamente en las células de Sertoli del testículo (Lacroix et al., 2001) y en el oído interno de ratón (cóclea y vestíbulo), en las células epiteliales especializadas en la regulación de la composición y la reabsorción de la endolinfa (Royaux et al., 2003).

Estudios *in vitro* utilizando diversos sistemas de expresión heterólogos, han mostrado que la pendrina es capaz de transportar diferentes aniones monovalentes como son: I^- , Cl^- , HCO_3^- , OH^- y formato, pero no SO_4^{2-} (Scott et al, 1999; Scott et al., 2000a; Royaux et al., 2001). Además, se ha visto que esta proteína funciona como un intercambiador, Cl^-/I^- y $Cl^-/base$ (Cl^-/HCO_3^- , Cl^-/OH^- y $Cl^-/formato$), (Scott et al, 2000a; Royaux et al., 2001; Yoshida et al., 2004). Asimismo, varios estudios en células de mamífero demuestran que la pendrina media el transporte de I^- desde el citosol al exterior celular, lo que concuerda con el flujo vectorial de I^- desde el citoplasma del tirocito al lumen folicular (Yoshida et al., 2002; Gillam et al., 2004).

Respecto a la regulación del gen *SLC26A4*, se ha demostrado que FOXI1 (*Forkhead Box I1*; MIM 601093) es un activador transcripcional de dicho gen. La proteína FOXI1, también conocida como FKHL10 (*Forkhead Drosophila Homolog-Like 10*), FKH10 o FREAC6 (*Forkhead-Related Activator 6*), es miembro de la familia de activadores de la transcripción “*Forkhead Related Activators*” (FREAC). Los 7 miembros humanos de esta familia se caracterizan por poseer un motivo de unión a DNA de 100 aminoácidos, denominado FKH box que fue originalmente identificado en *Drosophila* (Pierrou et al., 1994).

Los ratones *knockout Foxi1*^{-/-}, son sordos, no poseen potencial endococlear, y presentan un compartimento endolinfático gravemente dilatado (Hulander et al., 2003). En estos ratones no se detecta mRNA de *Slc26A4* en el epitelio del conducto y saco endolinfáticos, donde la expresión de ambos genes (*Foxi1* y *Slc26A4*) se solapa. Además, en los embriones *Foxi1*^{-/-}, el comienzo de la dilatación del compartimento endolinfático coincide con el comienzo de la expresión de *Slc26A4* en los embriones *Foxi1*^{+/+}. Estos hechos son pruebas de la regulación de *Slc26A4* mediada por *Foxi1*.

Por otro lado, el análisis de la región 5' del gen *SLC26A4*, reveló la existencia de dos secuencias de unión de FOXI1. Dichas secuencias, denominadas FBS1 y FBS2, están localizadas en el intrón 1 no codificante del gen *SLC26A4*, situadas en orientación inversa, “*head-to-head*” (Figura 7). La unión de FOXI1 a FBS1 se confirmó mediante ensayos de retraso en gel. Mutaciones puntuales en FBS1, la delección de uno de dichos motivos o el cambio de su situación relativa reducen drásticamente la transcripción de *SLC26A4*. Por tanto, FBS1 es un elemento regulador necesario para la activación transcripcional de dicho gen, mediada por FOXI1 (Yang et al., 2007).

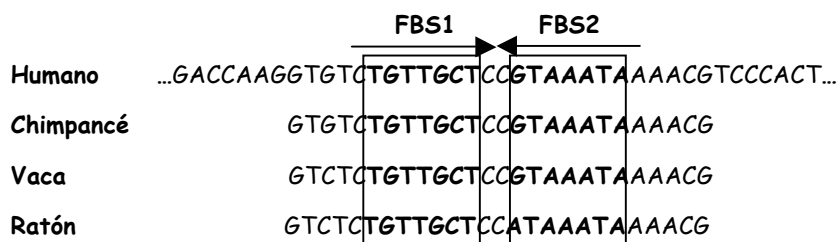


Figura 7. Conservación de los elementos reguladores FBS1 y FBS2 en mamíferos: FBS1 y FBS2 en negrita; las flechas indican la orientación, (adaptado de Yang et al., 2007).

Otros mecanismos que participan en el control transcripcional del gen *SLC26A4* en el tiroides están mediados por la TG y por ClC-5 (la proteína del canal de Cl⁻ dependiente de voltaje). La TG regula la función folicular mediante un mecanismo de retroalimentación (*feedback*) que anula su propia expresión, así como la de los genes *TPO*, *NIS* y *TSHR*, mediante la supresión de varios factores de transcripción específicos (TTF-1, Pax-8 y TTF-2), (Suzuki et al., 1998; Suzuki et al., 1999). Sin embargo, a bajas concentraciones, esta proteína aumenta los niveles de mRNA de *SLC26A4* (Royaux et al., 2000). Además, el aumento de la expresión de *SLC26A4* por la TG, es amplificado en presencia de TSH y/o cAMP, y por la acumulación de I⁻ intracelular (Suzuki et al., 2006). Por otra parte, se ha comprobado en los ratones *Clcn-5* ^{-/-}, que la ausencia del canal de Cl⁻ dependiente de voltaje (ClC-5) origina un bocio eutiroides con alteración de la organificación del yodo, que se correlaciona con una disminución de la proteína pendrina, y de los niveles de mRNA de dicha proteína (van den Hove et al., 2006).

4. MODELOS EXPERIMENTALES EN RATON

Los ratones *Knockout* (*Slc26a4* ^{-/-}) nacen sordos y muestran signos de disfunción vestibular. Además, presentan una grave dilatación del conducto y saco endolinfáticos, la cóclea y el sáculo. No obstante, al contrario de lo que ocurre en los individuos con PS, estos ratones no desarrollan bocio en ninguna etapa de su ciclo vital (Everett et al., 2001). También se ha observado que los ratones *Slc26a4* ^{-/-} no poseen potencial endococlear, pero mantienen las concentraciones de K⁺ endolinfático (Royaux et al., 2003; Wangemann et al., 2004). Dicha pérdida del potencial endococlear parece estar causada por la acidificación de la endolinfa y el aumento de la concentración de Ca²⁺ endolinfático, indicando que la pendrina podría estar mediando la secreción de HCO₃⁻ a la endolinfa (Wangemann et al., 2007).

OBJETIVOS

En el momento de inicio de este trabajo, nos propusimos profundizar en el conocimiento de las bases genéticas de las sorderas DFNB4 (síndrome de Pendred y sordera “EVA no sindrómica”), específicamente desarrollando el estudio de pacientes en la población española. Nos planteamos este trabajo con los siguientes objetivos.

1. Análisis genético de las familias

- 1.1. Análisis de ligamiento al locus *DFNB4*.
- 1.2. Análisis mutacional del gen *SLC26A4* en la población española.
 - Cribado de la población mediante diversas técnicas: heterodúplex, DGGE y DHPLC.
 - Caracterización de los cambios mediante secuenciación
- 1.3. Diseño de test genéticos fiables y rápidos para el diagnóstico de las mutaciones más frecuentes
- 1.4. Búsqueda y caracterización de deleciones intragénicas.
- 1.5. Investigación de un posible efecto fundador para las mutaciones más frecuentes.
- 1.6. Análisis del gen *FOXI1*
 - 1.6.1. Búsqueda de mutaciones en los casos con síndrome de Pendred sin mutaciones en el gen *SLC26A4*.
 - 1.6.2. Búsqueda de mutaciones en los casos “EVA no sindrómicos” con un único alelo *SLC26A4*.

2. Estudios funcionales de las mutaciones *missense*

3. Estudio de la relación genotipo-fenotipo en individuos portadores de mutaciones patogénicas del gen *SLC26A4*
4. Estudio de la prevalencia de las sorderas PS/“EVA no sindrómica”, en la población española.

PACIENTES Y METODOLOGIA

1. PACIENTES Y FAMILIAS

Todas las familias fueron seleccionadas a partir de una colección existente en nuestro laboratorio, compuesta por más de 1500 casos familiares y más de 800 casos esporádicos, enviados a nuestro laboratorio desde diferentes hospitales de la geografía española. Los casos familiares son aquellos que presentan, al menos, un familiar con sordera (hermanos, padres, tíos, abuelos), los casos esporádicos son los que no presentan antecedentes familiares de sordera, existiendo un único individuo afectado en la familia.

Previamente se realizó un examen físico y otológico de los pacientes por otorrinolaringólogos. El estudio de audición se realizó mediante otoscopia y, dependiendo de la edad del paciente, evaluando o bien la audiometría de vía aérea y ósea de los adultos; o las otoemisiones acústicas (OEA) y/o los potenciales evocados del tronco cerebral (PEATC) de los bebés.

Exámenes clínicos adicionales, para alcanzar un diagnóstico de síndrome de Pendred, incluyeron: (i) para el diagnóstico de las malformaciones del oído interno: tomografía computerizada (TC) de los huesos temporales; tomografía axial computerizada (TAC) de los huesos temporales; y/o resonancia magnética (RM) craneofacial. (ii) Para el estudio de la alteración del tiroides: ultrasonografía para la detección de bocio; estudio de la función tiroidea (niveles en sangre de tiroxina y tirotrópina); y test de descarga de perclorato. Para la realización de dicho test, se administró a los pacientes una dosis oral de ^{131}I y tras 2 horas, se midió la cantidad de yoduro radiactivo retenido en el tiroides. A continuación se administró una solución oral de perclorato sódico. El test fue considerado positivo cuando una hora después de la administración del perclorato, la cantidad de yoduro radiactivo en el tiroides había disminuido más de un 10% con respecto a la cantidad inicial.

Los pacientes cuya hipoacusia podía deberse a causas ambientales no fueron incluidos en este estudio.

Según los signos clínicos de los pacientes, las familias se clasificaron en tres grupos (Tabla 1). Los pacientes del grupo A presentaban sordera, malformaciones del oído interno (EVA asociada o no a malformación de Mondini) con bocio y/o un resultado positivo del test de descarga del perclorato. Los pacientes del grupo B con “EVA no sindrómico” también presentaban sordera neurosensorial autosómica recesiva EVA (con o sin Mondini), pero no presentaban alteraciones del tiroides. El test de

descarga de perclorato se realizó en 12 de los casos “EVA no sindrómicos”, resultando negativo en todos ellos.

Las familias del grupo C fueron seleccionadas a partir de las 500 primeras familias de la colección de casos familiares existente en el laboratorio. Todas ellas presentaban hipoacusia autosómica recesiva no sindrómica (HARNS) y en su mayoría presentaban dos o más individuos afectados, aunque algunas familias estaban constituidas por un individuo sordo y dos o más hermanos normo-oyentes. La mayor parte de pacientes de este grupo carecían de datos clínicos relativos a las malformaciones del oído interno y del tiroides.

GRUPO	FENOTIPO		Nº DE FAMILIAS INDEPENDIENTES	Nº DE INDIVIDUOS	
				SORDOS	SANOS
A	PS		12	21	40
B	“EVA no sindrómico”	Sin Mondini	27	35	66
		Con Mondini	8	8	9
C	HARNS		115	267	420
	TOTAL		162	331	535

Además, de las familias de los grupos A, B y C, se seleccionó un cuarto grupo — de “no riesgo” (D) — de 168 pacientes independientes. Este grupo incluye la totalidad de casos revisados por la Dra. C. Medà en el Servicio de Otorrinolaringología del Hospital de la Santa Cruz y San Pablo (Barcelona), en el periodo comprendido entre los años 1999-2007, exceptuando 7 casos con PS incluidos en el grupo A y 17 casos con sordera “EVA no sindrómica” incluidos en el grupo B. A todos los pacientes, en su mayoría niños, se les realizó un examen físico y otológico que se completó con una tomografía computerizada (TC) de los huesos temporales. También, en todos los casos, se realizó palpación del tiroides y ante la sospecha de bocio difuso y/o nodular, se realizaron los exámenes clínicos relativos a la glándula tiroidea, anteriormente indicados, incluyendo el test del perclorato. El total de casos remitidos desde el Serv. de ORL del Hospital Santa Cruz y San Pablo, excluidos los casos PS/“EVA no sindrómicos”, incluyen: 160 casos con hipoacusia no sindrómica, 5 casos en los que la hipoacusia estaba asociada a otros trastornos (sorderas sindrómicas distintas al PS) y

dos pacientes con otosclerosis. Adicionalmente, para la detección de mutaciones mediante SNaPshot, también se seleccionaron 195 casos esporádicos con sordera neurosensorial autosómica recesiva, pertenecientes a la colección de familias del laboratorio.

Se obtuvo el consentimiento informado de todos los individuos participantes en el estudio, previo a la extracción de una muestra de sangre periférica de cada uno de ellos. Además, en todas las familias del grupo de riesgo (A, B y C) se descartaron alteraciones de los genes responsables de sorderas congénitas neurosensoriales recesivas más frecuentes: *GJB2* que codifica la conexina 26, dos delecciones que incluyen entre otros al gen *GJB6* que codifica la conexina 30, la mutación p.Q829X en el gen *OTOF* que codifica la otoferlina y la mutación 1555A>G en el rRNA 12S mitocondrial.

2. EXTRACCION DE DNA GENOMICO A PARTIR DE SANGRE

La sangre se extrajo por punción venosa y fue recogida en tubos que contenían EDTA (5mM) como anticoagulante. El DNA genómico se extrajo siguiendo el método salino (Miller et al., 1988). La concentración del DNA se determinó por medida de absorbancia a 260nm (A_{260}) y su pureza se estableció a partir de la relación A_{260}/A_{280} .

En el caso de la familia S129, para la cuantificación de la región 5' del gen *SLC26A4*, el DNA genómico de los individuos S129.2 (madre), S129.3 (hija), S129.4 (hijo), C101 y C103 (individuos sin mutaciones en el gen *SLC26A4*) se purificó utilizando el kit FlexiGene DNA (QIAGEN).

3. EXTRACCION DE DNA PLASMIDICO

Los cultivos bacterianos se crecieron en medio LB (Miller et al., 1992). Para la purificación del DNA plasmídico se utilizó “QIAprep Miniprep” (Quiagen) siguiendo el procedimiento aconsejado por el fabricante.

Para los experimentos de transfección, los plásmidos fueron purificados con columnas NucleoBond® AX 500 y el NucleoBond® Buffer set I (MACHEREY-NAGEL).

4. ESTUDIO DE POLIMORFISMOS DE TIPO MICROSATELITE

4.1. Marcadores polimórficos ligados a *DFNB4*

Se utilizaron 7 marcadores polimórficos muy próximos a *SLC26A4*, cuyo orden es el siguiente: Cen-D7S501-D7S2420-D7S496-D7S2459-D7S3074-D7S692-D7S2425-Tel, encontrándose el *D7S2459* situado en el intrón 10 del gen *SLC26A4*. En algunos

casos en los que el marcador polimórfico *D7S2459* no fue informativo, también se analizó el marcador *D7S3312* que se encuentra situado a 400 pb de *D7S2459*. Todos los marcadores han sido descritos con anterioridad (Kacem et al, 2003), con la excepción del marcador *D7S3312* (GDB: 11511873) que fue identificado mediante inspección de la secuencia genómica del intrón 10 del gen *SLC26A4*. Dicha secuencia microsatélite se amplificó con los oligonucleótidos D7S3312U (5'-GAGCCAATATCG TGCCACTAC-3') y D7S3312L (5'-CTCCCTGG GCAAGTCACTG-3'). Un cebador de cada pareja de oligonucleótidos fue marcado fluorescentemente en el extremo 5' (FAM, TET, HEX). Las reacciones PCRs se realizaron en un termociclador Applied Biosystem Gene Amp PCR System 9700. La amplificación se llevó a cabo en un volumen de 15 µl, utilizando 2,5 nmoles de cada dNTP, MgCl₂ 1,5 mM, buffer de Fast Start Taq DNA polimerasa (Roche), 0,75 U de Fast Start Taq DNA Polimerasa (Roche), 10 pmoles de cada cebador y 40 ng de DNA genómico. Las condiciones de la reacción fueron: 94°C, 6 min; 30 ciclos de 45s. a 94°C, 45 s. a 56°C (58°C para el *D7S3312*); extensión a 72°C durante 5 min. Los productos PCR fueron comprobados en un gel de agarosa al 1,5% y posteriormente analizados por electroforesis de capilaridad en un equipo ABI PRISM™ 310 (Applied Biosystems).

4.2. Estudio de paternidad

En el caso de la familia E343, para excluir la posibilidad de una falsa paternidad, se analizaron 25 marcadores microsatélites situados en los cromosomas:

Cromosoma 2: Cen-*D2S206-D2S396-D2S2197-D2S164*-Tel, (base de datos de SNPs del NCBI).

Cromosoma 3: Cen-*D3S1300-D3S1285-D3S1566-D3S2454*-Tel, (base de datos de SNPs del NCBI).

Cromosoma 7: Cen-*D7S501-D7S2420-D7S496-D7S2459-D7S3312-D7S3074-D7S692-D7S2425*-Tel, (Everett et al., 1997; Kacem et al., 2003).

Cromosoma 10: Cen-*D10S192-D10S1265-D10S1710-D10S1697*-Tel, (base de datos de SNPs del NCBI).

Cromosoma 13: Cen-*D13S1835-D13S175*-Tel, para el marcador *D13S1835* se usaron los cebadores D13S1835-A (5'TCCATTTGCT CAGTAACTTTGTCC3') y D13S1835-B (5'CTATATTC CAGCCTGGGCAAGAG) y las mismas condiciones de amplificación del marcador *D13S175* (Dib et al., 1996; del Castillo et al., 2002).

Cromosoma 22: Cen-*D22S1045-D22S1456-D22S272*-Tel, (base de datos de SNPs del NCBI).

5. ANALISIS MUTACIONAL

Cada exón y las secuencias intrónicas flanqueantes de los genes *SLC26A4* y *FOXII* fueron amplificados a partir de 75 ng de ADN genómico, utilizando 10 pmoles de cada cebador (Tablas 1 y 4) en un volumen final de 25 µl conteniendo: 200 µM de cada dNTP, 1 U de Fast Start taq DNA polimerasa (Roche Diagnostics GMBH) y la concentración de MgCl₂ reflejada en las tablas 2 y 5. Las condiciones de amplificación fueron: 94°C, 6 min; 30 ciclos de 45 s. a 94°C, 45 s. a la temperatura de hibridación idónea (Tablas 2 y 5) y 1 min a 72°C; con un ciclo final de 72°C, 5 min.

5.1. Análisis mutacional del gen *SLC26A4*

El análisis se realizó sobre el caso índice de cada familia y, en caso de consanguinidad u homocigosis de los marcadores polimórficos ligados a *DFNB4*, también se incluyó a uno de los progenitores.

5.1.1. Análisis mutacional mediante heterodúplex (HDX)

Este método se basa en la formación de las moléculas de homodúplex y de heterodúplex por desnaturalización del producto de PCR y posterior renaturalización. La discriminación de ambos tipos viene dada por su diferente velocidad de migración en geles de polímero MDE (*Mutation Detection Enhancement gel*) (FMC Bioproducts, Rockland, ME). Los heterodúplex migran a menor velocidad que los correspondientes homodúplex debido a que poseen una zona en que las bases no están apareadas. Los productos PCR de cada exón se desnaturalizaron a 94°C y posteriormente se renaturalizaron, bajando su temperatura hasta 37°C, para permitir la renaturalización y la formación los heterodúplex. Las muestras se analizaron en un gel del polímero MDE (*Mutation Detection Enhancement gel*) (FMC Bioproducts, Rockland, ME) (Keen et al, 1991; White et al, 1992; Ganguly et al, 1993).

5.1.2. Análisis mediante DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*)

Esta técnica se basa en el mismo principio que los heterodúplex, pero las moléculas se separan de manera más eficiente al moverse en un gradiente desnaturizante. El exón 10 fue analizado mediante la técnica del DGGE, utilizando para su amplificación por PCR cebadores con colas GC (Sheffield et al 1989); pds10GC-U (5'GCCCCGCCGGCCCCGACCCCCGCGCGTCCGGCGCCCCGCGAAGGTCTTGCAAAGATTC3') y pds10GC-L (5'CCGCCATTCCTCGACTTGTTC3'), las condiciones de amplificación fueron las mismas que con la pareja de cebadores pds10U-pds10L, (Tabla 2). Las condiciones de electroforesis para la óptima resolución de los heterodúplex fue determinada usando el programa SQHTX (Lerman et al, 1989; Myers et al, 1987). Los productos PCR se cargaron en geles al 6.5% de poliacrilamida con un gradiente desnaturizante de incremento lineal del 35-75% (100% desnaturizante = 7 M de urea y 40% de formamida; acrilamida/bis-acrilamida = 37.5/1). La electroforesis se realizó en un aparato Hoeffer SE600 (LKB) con una corriente de 160 v durante 90 min.

5.1.3. Análisis mediante DHPLC (*Denaturing High Performance Liquid Chromatography*)

Mediante esta técnica los heterodúplex, térmicamente menos estables, se separan de los homodúplex por cromatografía líquida de fase reversa. Los productos PCR fueron analizados mediante DHPLC en un equipo WAVE® Nucleic Acid Fragment Analysis System (TRANSGENOMIC). La determinación de la temperatura necesaria para el análisis de cada amplicón se realizó utilizando el Navigator™ Software versión 1.6.2. Los resultados obtenidos se analizaron con este mismo software. Para el análisis de 20 exones *SLC26A4* se diseñaron 18 amplicones, con un tamaño de 200-700 pb, los exones 7-8 y 11-12 se analizaron en un único amplicón, en cada caso (Tablas 1, 2 y 3). En el análisis de los exones se incluyó un control positivo —mutante— siempre que fue posible.

5.1.4. Secuenciación

Los productos PCR, en los que el análisis mediante HDX, DGGE y/o DHPLC reveló presencia de heterodúplex, fueron secuenciados a partir de una nueva amplificación con el kit *dRhodamine terminator cycle sequencing Ready Reaction (con Ampitaq DNA polymerase, FS)* o *BygDye terminator cycle sequencing Ready Reaction* según las indicaciones del fabricante (Applied Biosystems). El análisis de las reacciones

de secuencia se realizó en un equipo ABI PRISM™ 3100 de cuatro capilares (Applied Biosystems), con el programa informático Sequencing Analysis v.5.1.1. (Applied Biosystems, Foster City, CA).

La numeración de las mutaciones está basada en la secuencia de cDNA *SLC26A4* (NM_000441), considerándose la A del codón de comienzo (ATG) como el nucleótido número 1.

Tabla 1. Secuencia de los cebadores utilizados para el estudio del gen *SLC26A4*.

CEBADOR	ORIENTACION	SECUENCIA (5'→3')
pds1U	DIRECTA	CCCTGCGTGGCAGCCAGTA
pds1L	REVERSA	TGAAGATGCCCACACCGCC
pds2U	DIRECTA	CTCCGATCGTCCTCGCTTA
pds2L	REVERSA	CCGTCCGCTTCTCTCTAC
pds2dhplcU*	DIRECTA	TCTTCCCCTCCGATCGTCCT
pds2dhplcL*	REVERSA	CCTCCCCAAGGCGTGGAC
pds3U	DIRECTA	TGAAAACCCAGTTTCTTGC
pds3L	REVERSA	CCTGCTGGAGACCAGAACTC
pds3dhplcU*	DIRECTA	TGCAAAATTGGTTGTGACTGAG
pds3dhplcL*	REVERSA	AACTCCTGCTGGAGACCAGA
pds4U	DIRECTA	AAGTTGAGGACTTTCTGCATAC
pds4L	REVERSA	TCATGTTTAAAGTGTTTGGC
pds5U	DIRECTA	TGCGTGTAGCAGCAGGAAGTA
pds5L	REVERSA	AAAACAAAGTAATTTCTGGAA
pds6U	DIRECTA	CAGGCAAACATTTAATTTTT
pds6L	REVERSA	GGAATGAACAGTGACCCATC
pds6dhplcU*	DIRECTA	AGCTTGATGTAATATTTCCAGAGAG
pds6dhplcL*	REVERSA	GGAATGAACAGTGACCCATC
pds7U	DIRECTA	ACCCTATGCAGACACATTGA
pds7L	REVERSA	ATTCCTTGTTTGTCACCAAATT
pds8U	DIRECTA	AAAACCAATGGAGTTTAAACA
pds8L	REVERSA	AAACCTTTTATTACAAGCTTCATT
pds9U	DIRECTA	GGTGGTCAAATCTTCACAGCA
pds9L	REVERSA	ACTGGTTTTATAGGGCTGGAAA
pds9dhplcU*	DIRECTA	GGAAAAAGGATGGTGGTCAA
pds9dhplcL*	REVERSA	TTTCCTGTTTCCAGCCCTA
pds10U	DIRECTA	CGAAGGTCTTGCAAAGATTCA
pds10L	REVERSA	GTGAGCTGGAAGACACAAGG
pds11U	DIRECTA	GAGAACAAGTCGAGGAATGG
pds11L	REVERSA	GCAATCGGTATGCAGAGAAG
pds12U	DIRECTA	CCATTCCCTGAATAACACAGC
pds12L	REVERSA	ATATGCTTCTGCCATATCAC
pds13U	DIRECTA	TTTGCTGGACTTGGGTTTAC
pds13L	REVERSA	CTCTGAGCTTCCTTATACCATTTT
pds14U	DIRECTA	ATTCCAAAATACGGCTGTTC
pds14L	REVERSA	TCACATGATGGTACCTGATACATT
pds14dhplcU	DIRECTA	GGCTCTTTAGTAGCTGTTGTTTT
pds15U	DIRECTA	TGAGGCTTGAAATTATTTAATCC
pds15L	REVERSA	TCTCAAAAAGAGGTTAGAAAACAAA
pds15dhplcU*	DIRECTA	CCTTGCTAAGTAGCCAGAAATG
pds15dhplcL*	REVERSA	TTGGACCCAGTAAATACTTGT

*Cebadores publicados (Prasad et al, 2004).

Tabla 1. Continuación

CEBADOR	ORIENTACION	SECUENCIA (5'→3')
pds16U	DIRECTA	GGTGCCAGGCATTTTAAGTA
pds16L	REVERSA	AAAGGAAATAATTTAAGGGGG
pds16dhplcU*	DIRECTA	CCTTTGAGAAATAGCCTTTCCAG
pds16dhplcL*	REVERSA	GCTCTCATCAGGGAAAGGAA
pds17U	DIRECTA	TTTGATATGAATGGTTGAAAGATT
pds17L	REVERSA	CATTTGGAGCTTTGGCAAT
pds18U	DIRECTA	GCTACTGAATTATGGGCAGAT
pds18L	REVERSA	CGGGAAAGTCTTACAGGTAGAT
pds18dhplcU*	DIRECTA	TCCTGAGCAAGTAAGTGAATGC
pds18dhplcL*	REVERSA	GAAAGGGCTTACGGGAAAGT
pds19U	DIRECTA	GGAAC TAACAAAACATTGTG
pds19L	REVERSA	CCTTTCTACAGATGTATCTTTTCT
pds20U	DIRECTA	TGGGTTGATGCTATTCTATTTT
pds20L	REVERSA	CCCTGACAGTTCTTAATCAGAT
pds21U	DIRECTA	GATAATGCAGACTTAAGGAGA
pds21L	REVERSA	AAGACAAAACCTTCTCAATG
pds21dhplcL	REVERSA	TGTAGATCAGCAGCGTATT

*Cebadores publicados (Prasad et al, 2004).

Tabla 2. Condiciones de la amplificación PCR de los exones del gen *SLC26A4*

EXON	CEBADORES	MgCl ₂ (mM)	T ^a de anillamiento (°C)	Tamaño (pb)	Tipo de estudio*
1	pds1U-pds1L	2	62	276	1, 3
2	pds2U-pds2L	2	60	264	1, 3
	pds2dhplcU-pds2dhplcL	1,5	62	292	2, 3
3	pds3U-pds3L	1,5	58	210	1, 3
	pds3dhplcU-pds3dhplcL	1,5	58	242	2, 3
4	pds4U-pds4L	2,5	58	232	1, 2, 3
5	pds5U-pds5L	1,5	58	366	1, 2, 3
6	pds6U-pds6L	1,5	58	250	1, 3
	pds6dhplcU-pds6dhplcL	1,5	58	288	2, 3
7	pds7U-pds7L	1,5	58	235	1, 3
8	pds8U-pds8L	2	58	213	1, 3
7-8	pds7U- pds8L	2	58	471	2, 3
9	pds9U-pds9L	1,5	60	235	1, 3
	pds9dhplcU-pds9dhplcL	1,5	60	254	2, 3
10	pds10U-pds10L	1,5	58	223	1, 2, 3
11	pds11U-pds11L	1,5	58	171	1, 3
12	pds12U-pds12L	1,5	58	208	1, 3
11-12	pds11U- pds12L	1,5	58	444	2, 3
13	pds13U-pds13L	2	60	234	1, 2, 3
14	pds14U-pds14L	2	60	164	1, 3
	pds14L-pds14dhplcU	1,5	60	196	2, 3
15	pds15U-pds15L	2	58	185	1, 3
	pds15dhplcU-pds15dhplcL	1,5	60	254	2, 3
16	pds16U-pds16L	1,5	58	179	1, 3
	pds16dhplcU-pds16dhplcL	2	62	241	2, 3
17	pds17U-pds17L	1,5	58	343	1, 2, 3
18	pds18U-pds18L	1,5	58	159	1, 3
	pds18dhplcU-pds18dhplcL	1,5	58	190	2, 3
19	pds19U-pds19L	1,5	58	216	1, 2, 3
20	pds20U-pds20L	1,5	58	225	1, 2, 3
21	pds21U-pds21L	2	58	145	1, 3
	pds21U-pds21dhplcL	2	53	344	2, 3

(*) 1: HDX; 2: DHPLC; 3: Secuenciación.

Tabla 3. Condiciones para el análisis por DHPLC.

EXON	METODOS (°C)	T.S.	% TAMPON B
2	67.3	0.6	53.3
3	60.8	0.6	51.5
4	58.4	1	50.3
	55.4	0.5	51.3
5	58.0	1	54.4
6	57.5	0.6	53.2
7-8	55.5	0.5	57.2
9	59.6	0	53.2
10	60.4	0.8	50.3
11-12	58.5	0.6	56.6
13	57.2	0.6	51.2
14	57.4	0.7	49.1
15	55.5	0	53.2
16	56.5	0.5	51.7
17	56.8	0.5	54.9
	59.3	1.5	52.9
18	55.8	0.4	49.4
19	58.5	1	49.6
20	56.0	0.7	50.6
21	57.5	0	55.9

% tampón B, acetonitrilo (fase líquida); TS, Time shift (tiempo de retención en la columna).

5.1.5. Detección de mutaciones mediante SNaPshot

Este método está basado en la extensión de un cebador en presencia de didesoxinucleótidos marcados fluorescentemente, la AmpliTaq DNA polimerasa aumenta la longitud del cebador en un nucleótido añadiendo un solo ddNTP en su extremo 3'. Las diferentes variantes de secuencia se van a distinguir por el ddNTP añadido en cada caso, y por la longitud del cebador que se haya empleado, lo que permite detectar varias mutaciones en un solo ensayo. Se diseñaron cebadores específicos para cada mutación (Tabla 4). Las reacciones de extensión de cebadores específicos (ejemplo, Figura 1), con ddNTP marcados fluorescentemente, se realizaron con el kit ABI Prism^R SNaPshotTM Multiplex System según las indicaciones del proveedor. Los productos resultantes se resolvieron en un analizador genético ABI PRISM 3100 Avant (Applied Biosystems). Según su Ta, su longitud y el ddNTP incorporado se diseñaron cuatro mezclas (p1T-p4T) conteniendo cuatro cebadores cada uno. Los moldes empleados para todas las reacciones de extensión de cebador fueron los productos de PCR que se amplificaron con los mismos cebadores del análisis por heterodúplex, (Tablas 1 y 2).

Tabla 4. Condiciones y secuencia de los cebadores para el SNaPshot.

GRUPO	MUTACION	ORIENTACION	SECUENCIA (5'→3')
p1Tduplicado	p.V88I	DIRECTA	AGGAATGGCTGCTTAGTGAC
p1T	p.P140H	DIRECTA	AGACTTTTTTCCCCAGGAC
p1T	p.G424D	REVERSA	CAATCGCAGCAGAGATGATG+16A
p1T	c.1197delT	REVERSA	CAGTGGTGGCCACAAAACA
p1T	p.T416P	REVERSA	CCTACCTGTGTCTTTCTCCAG
p2T	c.1001+5G>T	REVERSA	GTACTAAGAGGAACACCACA+11A
p2T	p.T485R	REVERSA	CAGAATGATGGACACTATACAC+21A
p2T	p.Q514K	DIRECTA	TGACTGTGGTCCTGAGAGTT+16A
p2T	p.R409H	DIRECTA	CCACCACTGCTCTTTCCC+4C
p3T	p.V138F	DIRECTA	GGAACATCAAGACATATCTCA+22A
p3T	p.G209V	REVERSA	GCCAAGTACCTCACTATGAAT+15A
p3T	c.1001+1G>A	REVERSA	AAGAGGAACACCACACTCA+10A
p3T	p.L445W	REVERSA	GCAGGGTTATACCTTCTGC+3A
p4T	c.279delT	DIRECTA	ATATAGTGACGTCATTTCTGGGAGTTAG
p4T	p.T410M	DIRECTA	ACCACTGCTCTTTCCCGCA
p4T	p.Q413P	REVERSA	TGTCTTTCCTCCAGTGCTCTCC
p4T	p.G497S	DIRECTA	CATTCTGGGGCTGGATCTC

p1Tduplicado; p.V88I, p.P140H, p.Q413P, p.G424D, panel alternativo al p1T, para detectar dichas mutaciones en controles sanos de la población española. Temperatura de anillamiento: p1T y p1Tduplicado 60°C, p2T-p4T 55°C.

Figura 1. Secuencia del exón 4 y regiones adyacentes.

Exón 4: V138F(grupo p3T)

aagttgaggactttctgcatactgtaactttggtttgtgaatgtaatcactttgcatgtgctttcag[ggatggcatatgccctacta
gctgcagttcctgtcggatatggtctctactctgctttttccctatcctgacatactttatctttggaacatcaagacatatctcagtt
g]gtaattataagtatattttacaattatatttctcatgtttaaagtgttttggc

Los corchetes indican el comienzo y final de dicho exón. La caja sombreada muestra la secuencia del cebador utilizado para la detección de la mutación c.412G>T (p.V138F), cuya posición en la secuencia se denota en letra negrita.

5.2. Análisis mutacional del gen *FOXI1*

El análisis del gen *FOXI1* se realizó mediante secuenciación directa de los exones 1 y 2 (tablas 5 y 6) como se ha descrito más arriba.

Tabla 5. Secuencia de los cebadores utilizados para el estudio del gen *FOXI1*.

CEBADOR	ORIENTACION	SECUENCIA (5'→3')
FOXI 1-1U	DIRECTA	TGGAGGCTGAGGGAGGGC
FOXI 1-1L	REVERSA	GGGCAGGTAGGGTGGCG
FOXI 1-2U	DIRECTA	CCTACCTCTGGTTCAACGGG
FOXI 1-2L	REVERSA	TTCTCTTCCTTTTCTGCGG
FOXI 1-2Usec	DIRECTA	AAGGAGGAACAGAAGCAAAGCA
FOXI 1-2Lsec	REVERSA	GGTCTTGGGGAGGAAGGAAGTG
FOXI 1-3U	DIRECTA	TGGACCCTGGACCCAAC
FOXI 1-3L	REVERSA	GCTGGCATGGAGGACCTCTAC

Tabla 6. Condiciones de amplificación para el estudio de los exones del gen *FOXI*

EXON	CEBADORES	MgCl ₂ (mM)	T ^a de anillamiento (°C)	Tamaño (pb)
1	FOXI 1-1U/FOXI 1-1L	1	66	411
2-3	FOXI 1-2U/FOXI 1-2L	1,5	62	2000
3	FOXI 1-3U/FOXI 1-3L	2	62	617

6. CARACTERIZACION DE LA DELECIÓN INTRAGENICA DEL GEN

SLC26A4 (g.8091T_22145Cdel)

La familia S129 fue genotipada mediante la secuenciación de 17 cambios polimórficos (SNPs) del gen *SLC26A4* obtenidos de la base de datos de SNPs del NCBI. Se diseñaron cebadores específicos y se ajustaron las condiciones de las reacciones de amplificación (Tabla 7). Los productos PCR fueron analizados por secuenciación directa.

La cuantificación de los exones 1-10 (región 5' del gen *SLC26A4*) se realizó por PCR cuantitativa a Tiempo Real, utilizando como molde DNA genómico de los hijos, la madre y un control. Para este análisis se diseñaron cebadores específicos, con el programa informático PRIMER EXPRESS® SOFTWARE versión 3.0 (Applied Biosystems), y se ajustaron las condiciones de las reacciones de amplificación (Tabla 8). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un aparato 7300 Real-Time PCR (Applied Biosystems), en un volumen de reacción de 25µl, una temperatura de anillamiento de 60°C, durante 35 ciclos; con 100 nmoles de cada cebador y 12,5 µl de Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). La cuantificación absoluta de los amplicones procedentes de la madre y los individuos afectados se estableció mediante la comparación con un rango de diluciones en serie de un DNA control (12.5, 25, 50, 100 ng/µl).

Tabla 7. Cebadores y condiciones utilizados para genotipar la familia S129.

INTRON	SNP	ORIENTACION	SECUENCIA (5'→3')	Ta (°C)	TAMAÑO (pb)
2	rs2248465U	DIRECTA	ATTAAAAATGTGAGCGAGGG	54	292
	rs2248465L	REVERSA	GGGCACAAGAGTCTTTAGCA		
3	rs2701687U	DIRECTA	TTCACCTTGTCTATTATGCTTAGG	54	291
	rs2701687L	REVERSA	AAACCCCATCTCTACTAAAAATACA		
	rs3823957U	DIRECTA	TTGACTTGATTGTTTTTCC	54	368
	rs3823957L	REVERSA	GATAGCCTAAGCGATGATGT		
4	rs11769313U	DIRECTA	AGATCCACAGAGATCAGGACATT	54	261
	rs11769313L	REVERSA	AGAAATAGGCGAGAGAGACAC		
5	rs3817613U	DIRECTA	CACCTATTAAGGCTCACTTATCA	51	412
	rs3817613L	REVERSA	GAAAAGGAAAGAAAAATTAATG		

En todos los casos se utilizó 1,5 mM de MgCl₂.

Tabla 7. Continuación

INTRON	SNP	ORIENTACION	SECUENCIA (5'→3')	Ta (°C)	TAMAÑO (pb)
6	rs10276013U	DIRECTA	AAGGCCATGTACACATATCTAAGAA	51	102
	rs10276013L	REVERSA	TGTTGAATGGATGGAGTGTAATAGT		
	rs2712212U	DIRECTA	GTAGTTATCCCATTTTCTTTTTC	54	277
	rs2712212L	REVERSA	GGAACACATTCAAGAAGAGTAAG		
8	rs2395911U	DIRECTA	GGAAAAAAATTACAATGCT	51	273
	rs2395911L	REVERSA	AAGAAAATCAAGAAAAAAGA		
	rs1858929U	DIRECTA	ACTAGGCAGCCAGGCAGGCAAA	59	345
	rs1858929L	REVERSA	TCTGCCCTTG TAGCCTTACTCTCCC		
12	rs2188561U	DIRECTA	AAATATAAAATGAATGAAGTCACAA	54	345
	rs2188561L	REVERSA	TTTTTTTCTTTTGAGATAGGGT		
14	rs982915U	DIRECTA	TTCTGTGATTCTCTGGGTTCTATTT	54	303
	rs982915L	REVERSA	GACAACAGGTTACAAAAACTCTTGG		
17	rs982663U	DIRECTA	GGTACTAGGTAGGTAGGGTAGA	51	383
	rs982663L	REVERSA	CCCATAGTCAATAATAAAAGAG		
18	rs13245080U	DIRECTA	TGCTATTACCTCTCTCTCCTGATTT	53	305
	rs13245080L	REVERSA	TTCTTGAGCTTTGCCCTCC		
	rs12705418U	DIRECTA	GGTCAGAGGATCACTTCAGG	54	329
	rs12705418L	REVERSA	ACACACATACATTCAATAAGAAACA		
19	rs2712207U	DIRECTA	TGGGATGGATTTTTTTTGGAC	54	279
	rs2712207L	REVERSA	TGTGATGGTAAATAAAGGGATAGG		
20	rs6975897U	DIRECTA	CCTTCCTTAGCAACACAGAC	54	304
	rs6975897L	REVERSA	CCTGCTCAATAGAAGCTAAAA		
21	rs2712218U	DIRECTA	GATGCAGACAAATGAAATAATAA	51	351
	rs2712218L	REVERSA	AGATTTTTTTTTTAAGTGGTCAG		

En todos los casos se utilizó 1,5 mM de MgCl₂.

Tabla 8. Cebadores usados para la cuantificación por PCR a tiempo real.

EXON	ORIENTACION	SECUENCIA (5'→3')
1	DIRECTA	CCGCAGCCTGTGTGTGTCT
	REVERSA	AAGGCAGTGGGACGTTTTATTAC
2	DIRECTA	CGCGGCCGGTCTACAG
	REVERSA	TCTCCCGCAGCGTCTTG
3	DIRECTA	GCCTTTGGTGTGCTAAAGACTCTT
	REVERSA	GCCATTCCTTGACTCGGTATTT
4	DIRECTA	AATCACTTTGCATGTGCTTTCAG
	REVERSA	GGGAAAAAAGCAGAGTAGAGACCAT
5	DIRECTA	AATGGTGGGATCTGTTGTTCTGA
	REVERSA	TTCCATTGCTGCTGGATACG
6	DIRECTA	GGTACTTGGCAGATCCTTTGGTT
	REVERSA	TCTTTAGCTGTGAGACCAGCACTT
7-8	DIRECTA	TGGTGATACCAATCTTGCTGATTT
	REVERSA	GGACTGGGATTTTGTGTCTAAACC
9	DIRECTA	GGATGGTGGTCAAATCTTCACA
	REVERSA	GCCAGCATCTCCGAGAACAA
10	DIRECTA	GTTGTCATCCAGTCTCTTCCTTAGG
	REVERSA	GCCACAAAACAAGAGAAGAATCCT

Para tallar la extensión de la delección se generó un amplicon por PCR de amplio rango con los cebadores pds3dhplcU y pds7L (Tabla 1), 300 ng de DNA genómico y la mezcla enzimática ExpandTM High Fidelity PCR System (BOEHRINGER MANNHEIM), a una Ta de 55°C, siguiendo las recomendaciones del proveedor para fragmentos de 1-10 kb. El producto PCR fue digerido con las enzimas de restricción: *Bam* HI, *Bgl* II y *Cla* I. Tras este análisis, se realizó una nueva amplificación PCR con los cebadores 6568pb-U (5'- AGTGTGAAGGTTAGAGGA GAGG-3') y pds7L. Los puntos de rotura se caracterizaron secuenciando este último producto PCR con dichos cebadores.

Se diseñó un test específico para la detección de la delección mediante amplificación por PCR con los oligonucleótidos del14KbU (5'-AACAACTCCGAGA AGACC-3') y del14KbL (5'- AAGATGTCTTAAAAGAAAAAATG-3'). La reacción de PCR se realizó con 1,5 mM de MgCl₂, 10 pmoles de cada cebador y 1 U de la enzima Fast Start taq DNA polimerase (Roche) en un volumen final de 15 µl con una Ta de 51°C.

7. CLONAJE DE LA MUTACION *DE NOVO*

Se amplificó un fragmento del gen *SLC26A4*, de 4485 pb que abarca desde el exón 10 al exón 11. Para ello se realizó una PCR de amplio rango, con los oligonucleótidos pds10-11U (5'-GTTGTCATCCAGTCTCTTCCTT-3') y pds10-11L (5'-GGTTTTCCA TGTGATGATTGTTA-3'), con 100 ng de DNA genómico del caso índice E343.1, utilizando 15 pmoles de cada cebador en un volumen final de 25 µl conteniendo: 200 µM de cada dNTP, 2,5 mM de MgCl₂ y 1,25 U de la enzima EcoTaq-Plus (Ecogen). Las condiciones de amplificación fueron: 94°C 3 min; 30 ciclos a 94°C 1 min, 56°C 1 min, 72°C 4 min y extensión a 72°C 5 min. El producto PCR se purificó mediante el QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) y extracción fenólica; y se clonó en el vector pSMART-cDNA (Lucigen Corporation), según las recomendaciones del proveedor. Seguidamente, se aislaron varios plásmidos recombinantes que fueron caracterizados mediante el genotipado de los marcadores intrónicos *D7S3312* y *D7S2459*, y la secuenciación de las secuencias exónicas.

8. TEST DIAGNOSTICOS PARA LA DETECCION DE MUTACIONES EN EL GEN *SLC26A4*

Paralelamente al análisis mutacional por heterodúplex, se diseñaron test de detección mediante enzimas de restricción para los cambios: p.V88I, p.Q413P y p.D724G.

8.1. Detección de la variante alélica p.V88I

El DNA genómico fue amplificado por PCR utilizando la pareja de cebadores pds3U y pds3L (tabla 1 y 2) obteniéndose un producto de 210 pb que fue digerido con la enzima de restricción *Aat* II. El producto PCR del alelo mutante (p.V88I) pierde la diana para dicha enzima.

8.2. Detección de la variante alélica p.Q413P

El producto de 223 pb resultante de la amplificación por PCR, con la pareja de cebadores pds10U y pds10L (tabla 1 y 2), a partir de DNA genómico fue digerido con la enzima de restricción *Msp* I. En el amplicón del alelo mutante (p.Q413P) aparece un sitio de corte para *Msp* I, obteniéndose dos fragmentos en la digestión; uno de 145 pb y otro de 78 pb.

8.3. Detección de la variante alélica p.D724G

A partir de DNA genómico se amplificó por PCR un producto de 216 pb, con la pareja de cebadores pds19U y pds19L (tabla 1 y 2). El producto PCR se digirió con la enzima de restricción *Nco* I. El amplicón del alelo mutante (p.D724G) contiene un sitio de corte para la enzima *Nco* I, generando dos fragmentos de 111 pb y de 105 pb.

9. MUTAGENESIS DIRIGIDA

Se generaron 10 variantes alélicas —p.E29Q, p.V88I, p.V88I/p.R409H, p.P140H, p.Q413P, p.G424D, p.T485R, p.Q514K, p.L597S y p.D724G— de la secuencia codificante del gen *SCL26A4* clonada en el vector pIRES2-*EYFP* (figura 2). Este vector es una modificación, realizada en el laboratorio del Dr. Paulmichil, del vector bicistrónico de expresión en mamíferos con resistencia a kanamicina pIRES2-EGFP (Clontech). De forma resumida, para la obtención de cada variante alélica se diseñaron parejas de cebadores, utilizando el programa *QuikChange® Primer Design Program* (Stratagene, [www.stratagene.com/qcprimer design](http://www.stratagene.com/qcprimer%20design)). En dichos cebadores la última base de la posición 3' no es complementaria, para introducir la mutación en dicho gen (tabla 9A). Las reacciones se realizaron mediante el *Quick Change site-directed mutagenesis kit*

(Stratagene) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante; este kit permite la realización de una mutagénesis dirigida en cualquier plásmido de doble cadena. En cada clon recombinante, las secuencias de los genes *SLC26A4* y *EYFP* fueron verificadas en su totalidad, mediante secuenciación (tabla 9B).

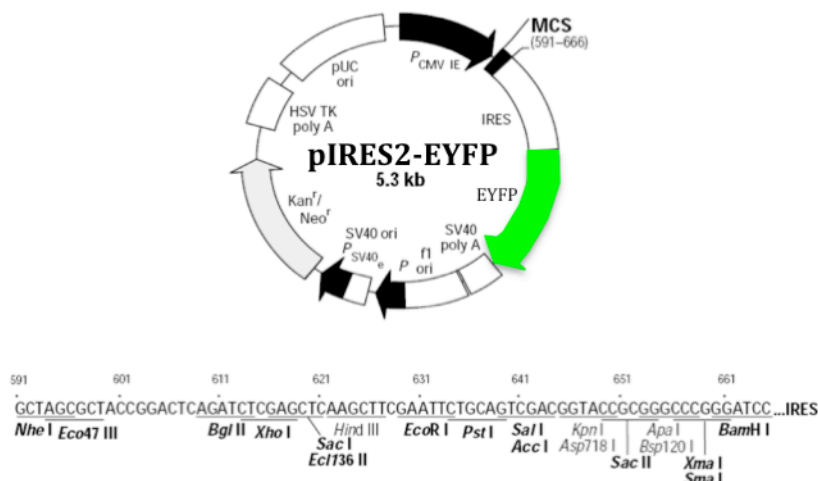


Figura 2. Esquema del vector pIRES2-EYFP (adaptado del vector pIRES2-EYFP, catálogo de Clontech).

Tabla 9A. Cebadores utilizados para la mutagénesis dirigida.

CEBADOR	ORIENTACION	SECUENCIA (5'→3')
E29Q-U	DIRECTA	GCCGGTCTACAGCCAGCTCGCTTTCCAG
E29Q-L	REVERSA	TGGAAAGCGAGCTGGCTGTAGACCGGC
V88I-U	DIRECTA	GGCTGCTTAGTGACATCATTTCCGGAGTTAG
V88I-L	REVERSA	CTAACTCCCGAAATGATGTCATAAGCAGCC
P140H-U	DIRECTA	CAAGACATATCTCAGTTGGACATTTTCCAGTGGTGAGTTTAAT
P140H-L	REVERSA	ATTAAACTCACCAGTGGAAAATGTCCAAGTATGATCTTG
R409H-U	DIRECTA	ACTGCTCTTTCCACACGGCCGTCCAGGA
R409H-L	REVERSA	TCCTGGACGGCCGTGTGGGAAAGAGCAGT
Q413P-U	DIRECTA	GCACGGCCGTCCCGGAGAGCACTGG
Q413P-L	REVERSA	CCAGTGCTCTCCGGGACGGCCGTGC
G424D-U	DIRECTA	AAGACACAGGTTGCTGACATCATCTCTGCTGCG
G424D-L	REVERSA	CGCAGCAGAGATGATGTCAGCAACCTGTGTCTTTC
T485R-U	DIRECTA	TTGATGCTGTTATCTGGGTGTTTAGGTGTATAGTGTCC
T485R-L	REVERSA	GGACACTATACACCTAAACACCCAGATAACAGCATCAATC
Q514K-U	DIRECTA	GACTGTGGTCTTGAGAGTTAAGTTTCTTCTTGGA
Q514K-L	REVERSA	TCCAAGAAGGAACTTAAGTCTCAGGACCACAGTC
L597S-U	DIRECTA	GAAACTAATAAAAAGTGGACAATCAAGAGCAACAAAGAATGGCATC
L597S-L	REVERSA	GATGCCATTCTTTGTGTCTCTTGATTGTCCACTTTTATTAGTTTC
D724G-U	DIRECTA	CATTCTTTTGGACGGTCCATGGTGCTATACTCTATCTACAGAA
D724G-L	REVERSA	TTCTGTAGATAGAGTATAGCACCATGGACCGTCAAAAAGAATG

Tabla 9B. Cebadores usados para la secuenciación de los genes *SLC26A4* y *EYFP*.

CEBADOR	ORIENTACION	SECUENCIA (5'→3')	GEN
1118 FWD	DIRECTA	TGTATGGGATCTGATCTGGG	<i>EYFP</i>
2192 REV	REVERSA	AACCACAAC TAGAATGCAG	<i>EYFP</i>
Nt	DIRECTA	AATGGGCGGTAGGCGTGTAC	<i>SLC26A4</i>
RTex4U	DIRECTA	TCGGATATGGTCTCTACTCTG	<i>SLC26A4</i>
RT7U	DIRECTA	GGTGATACCAATCTTGCTGATTTC	<i>SLC26A4</i>
RT14-15U	DIRECTA	AGAATTACAAAAACATTGAAGA	<i>SLC26A4</i>

10. CULTIVO CELULAR Y TRANSFECCION TRANSITORIA

Células HEK 293 Phoenix (DiCiommo et al., 2004) se crecieron en el Medio Mínimo Esencial Eagle (Sigma) suplementado con 10% de suero bovino fetal (Cambrex BioScience), 2 mM L-glutamina, 100 unidades/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomicina, 1 mM ácido pirúvico (sal sódica). Las células se mantuvieron en un incubador a 37°C 5% CO₂: 95% humedad; rutinariamente se establecieron subcultivos cada segundo o tercer día sembrando las células en placas de Petri (Ø 10 mm) después del tratamiento con tripsina/EDTA.

Para los ensayos funcionales fluorométricos, las células HEK 293 Phoenix fueron transfectadas transitoriamente, mediante precipitación con fosfato de calcio, con el plásmido SLC26A4 silvestre, los plásmidos resultantes de la mutagénesis dirigida (apartado 9), o con el plásmido vacío (pIRES2-EYFP; control negativo). Un día antes de la transfección las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos (Ø 35 mm) y se crecieron hasta alcanzar una confluencia del 60-80%. Para cada pocillo, 3 µg de DNA plasmídico resuspendido en 61,5 µl de H₂O, 7,5 µl de tampón A (CaCl₂ 2,5 M) y 75 µl de tampón B (NaCl 140 mM, Na₂HPO₄ 1,5 mM, HEPES 50 mM, pH 7 ajustado con NaOH). La mezcla de transfección se añadió sobre las células, agregándola al medio de crecimiento y después de una incubación de 8-10 horas, las células fueron lavadas dos veces con medio fresco. A las 24 horas, las células se sembraron en soportes de cristal (Ø 40 mm) tratados con poli-L-lisina, y se mantuvieron en medio complementado con suero. Las mediciones de fluorescencia se realizaron 48-56 horas después de la transfección, en ausencia de suero, utilizando las soluciones salinas que se describen a continuación.

11. ANALISIS FUNCIONALES (MEDICIONES DE FLUORESCENCIA)

Los soportes de cristal conteniendo las células transfectadas se colocaron en una cámara de flujo laminar (FCS2 System, Biopthechs Inc., Beck Road Butler, PA, USA) las células se lavaron con: una solución isotónica “rica” en Cl⁻ (KCl 2 mM, NaCl 135 mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 1 mM, Glucosa 10 mM, HEPES 20 mM a pH 7,4, 308 mOsm con

manitol) y otra “rica” en I^- (KCl 2 mM, NaI 135 mM, $MgCl_2$ 1 mM, $CaCl_2$ 1 mM, Glucosa 10 mM, HEPES 20 mM a pH 7,4, 308 mOsm con manitol), inyectadas con flujo constante de 0,3 ml/min, a temperatura ambiente. El flujo de entrada del I^- , en las células, puede ser medido mediante la sustitución de la solución “rica” en Cl^- por la “rica” en I^- . Así mismo, el flujo de salida del I^- es medido después de sustituir la solución “rica” en I^- por la “rica” en Cl^- .

Las medidas de fluorescencia de EYFP se realizaron con un microscopio confocal Leica TCS SP2 AOBS (Leica Microsystem, Heidelberg, Alemania), excitando la fluorescencia de EYFP con un Laser Ar/ArKr de 515 nm. El incremento de la fluorescencia se calcula según la fórmula de la figura 3. En los sucesivos cambios de solución (Cl^-/I^- y viceversa) se determina el valor máximo del incremento de fluorescencia.

$$\Delta F\% = \frac{\text{VALOR DE } I^- \times 100}{\text{VALOR DE } Cl^-} - 100$$

Figura 3. Fórmula para el cálculo de las variaciones máximas de fluorescencia ($\Delta F\%$). Valor de I^- o Cl^- , media de los cinco valores de fluorescencia anteriores o posteriores al cambio de solución (Cl^-/I^- y viceversa).

12. ANALISIS *IN SILICO*

Para el análisis de las secuencias se utilizaron los programas BLASTN y FASTA.

La conservación de los residuos en la península fue determinada a través de la página web ClustalW EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). El archivo de entrada para la conservación entre los ortólogos incluye las secuencias proteicas de *SLC26A4* de: *H. sapiens*, *R. norvegicus*, *M. musculus*, *P. troglodytes*, *M. mulata*, *C. familiaris*, *B. taurus*, *M. domestica*, *G. gallus* y *D. rerio*.

El efecto de las mutaciones localizadas en los sitios consenso de *splicing* 5' y 3' se investigó usando el programa BDGP (Berkeley Drosophila Genome Project) Splice Site Prediction by Neural Network (<http://www.fruitfly.org>) y el programa ESEfinder v.3.0 (<http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/esefinder.cgi?process=home>).

La búsqueda de los distintos SNPs del gen *SLC26A4* se realizó a través de la base de datos del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP).

La búsqueda de elementos repetitivos en los intrones 3 y 6 del gen *SLC26A4* se llevó a cabo usando la página web RepeatMasker (<http://ftp.genome.washington.edu/cgi-bin/>). MAR-Wiz, se utilizó para la búsqueda de regiones S/MARs (*scaffold/matrix attachment regions*) (<http://www.futuresoft.org/>). UCSC Genome Bioinformatics (<http://www.genome.ucsc.edu/>), se utilizó para los análisis de homología de secuencia y para determinar el contenido en G+C. La búsqueda de elementos palindrómicos se realizó con Palindrome (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/palindrome.html>). PatSearch, se utilizó para buscar motivos de secuencia de DNA asociados a los puntos de rotura de deleciones y translocaciones (<http://www.ba.itb.cnr.it/BIG/PatSearch/>).

RESULTADOS

1. ANALISIS DE LIGAMIENTO AL LOCUS *DFNB4*

Los estudios genéticos se iniciaron genotipando las familias afectadas con un conjunto de marcadores polimórficos ligados al locus *DFNB4* (Figura 1). Este análisis se realizó en 162 familias independientes de la población española (ver pacientes y metodología) con un total de 331 pacientes con hipoacusia autosómica recesiva que fueron clasificados, en tres grupos: A) 12 familias con 21 individuos diagnosticados de PS; B) 35 familias con al menos un afectado de sordera que presentaba malformaciones del oído interno tipo EVA (con o sin malformación de Mondini), —sordera “EVA no sindrómica”—. C) 115 familias con sordera autosómica recesiva no sindrómica y número de miembros suficiente para realizar un análisis de compatibilidad de ligamiento al locus *DFNB4*. En la mayoría de estas familias, el análisis de ligamiento no

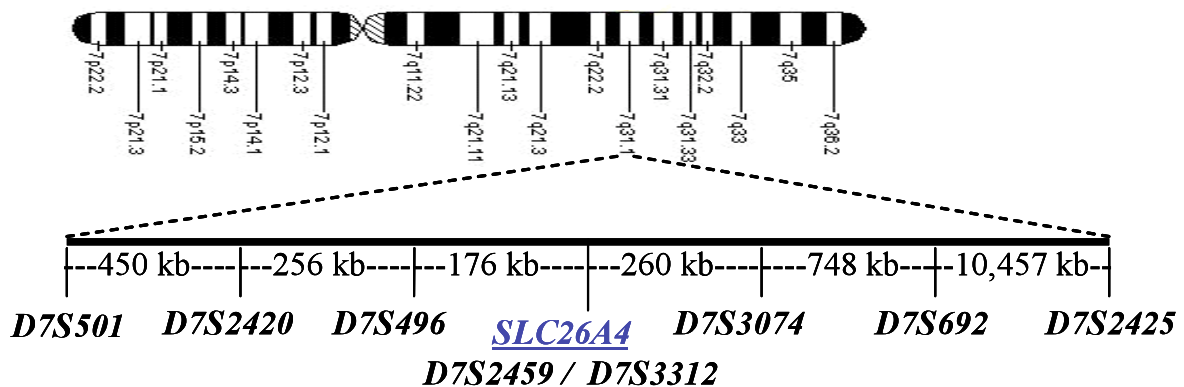


Figura 1. Región cromosómica correspondiente al locus *DFNB4*. Se muestra el orden relativo de los marcadores microsatélite utilizados para el análisis de ligamiento y las distancias físicas que hay entre ellos. En azul se denota la posición del gen *SLC26A4*.

permite obtener valores de *lod score* que estadísticamente demuestran el ligamiento ($\theta \geq 3$), sin embargo el análisis de segregación de los haplotipos —informativo en todos los casos— nos permitió seleccionar 20 familias del grupo C en las que se encontró compatibilidad de ligamiento a *DFNB4* y excluir las 95 familias restantes. Además, en dos familias del grupo A (E343 y E67) y en una familia del grupo B (S436), se obtuvo incompatibilidad de ligamiento a *DFNB4* (Figura 2). En las dos familias del grupo A, el caso índice y su hermano/a sano/a eran haploidénticos; mientras que en la familia del grupo B ambos hermanos presentaban sordera profunda bilateral asociada a EVA y no compartían haplotipos paternos ni maternos. A pesar de los resultados del análisis de

ligamiento, las tres familias fueron incluidas en el estudio mutacional del gen *SLC26A4* por presentar signos clínicos compatibles con las sorderas PS/“EVA no sindrómica”.

En total, tras el análisis de haplotipos, se seleccionaron 67 familias consideradas de riesgo, que incluían: todas las familias del grupo A, todas las del B y las 20 familias del grupo C con compatibilidad de ligamiento a *DFNB4*. En todos los pacientes a riesgo se había confirmado que su sordera no estaba asociada a alguna de las alteraciones genéticas más prevalentes. En concreto se descartaron mutaciones en el gen *GJB2* (Cx26) y dos deleciones que incluyen entre otros al gen *GJB6* (Cx30) del locus *DFNB1* (22%), la mutación p.Q829X en el gen *OTOF* (otoferlina) (3,3%) y la mutación 1555A>G en el rRNA 12S mitocondrial (11%).

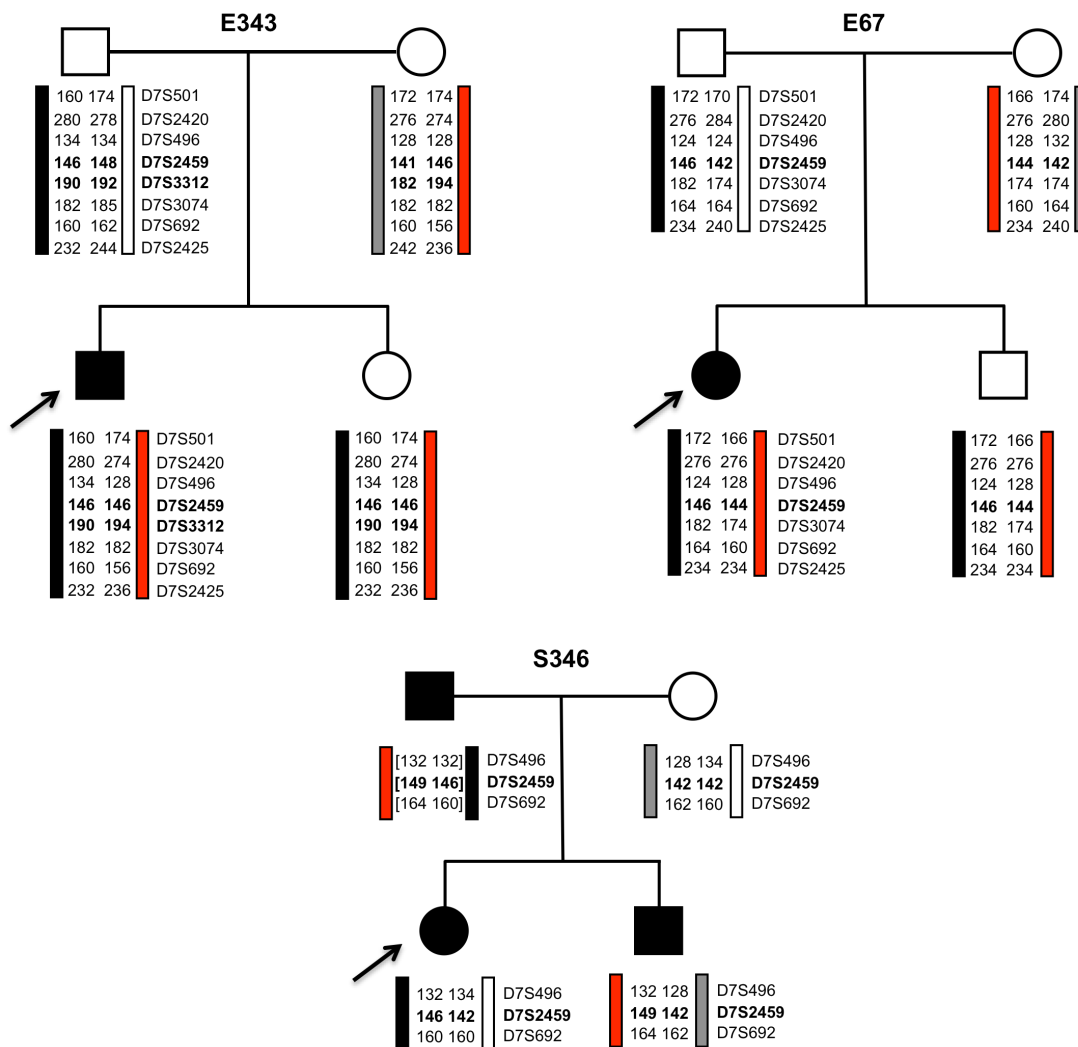


Figura 2. Análisis de haplotipos de las familias E343, E67 y S436 con marcadores microsatélite flanqueando al gen *SLC26A4* y marcadores microsatélite intragénicos, en negrita. Las flechas indican el caso índice. Los números indican el tamaño de los alelos en pares de bases.

2. DETECCIÓN DE MUTACIONES EN EL GEN *SLC26A4*

El gen *SLC26A4* comprende 21 exones, siendo el primero no codificante. En este exón 1 se encuentran los motivos de secuencia FSB1 y FSB2 que median la unión de FOXI1, activador transcripcional de dicho gen.

A lo largo de este estudio se han aplicado distintas técnicas, más o menos eficaces, para la detección de mutaciones en la secuencia del gen *SLC26A4*. En concreto, se han utilizado tres técnicas: heterodúplex, DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) y DHPLC (*Denaturing High Performance Liquid Chromatography*). Todas ellas permiten la detección de cambios puntuales en un amplicón, siempre que ocurran en heterocigosis. Los tres métodos están basados en la separación de las moléculas homodúplex y heterodúplex formadas por desnaturalización del producto PCR y posterior renaturalización (ver pacientes y metodología, apartado 5.1), (Figura 3). Mediante el análisis de heterodúplex de los 20 exones codificantes (2-21) del gen *SLC26A4*, de 44 casos índice pertenecientes a familias del grupo de riesgo (A, B, C), se detectaron 14 cambios puntuales diferentes (Tabla 1). En los casos en los que no se encontró el segundo alelo mutado, se secuenciaron los 21 exones del gen *SLC26A4*, encontrándose cuatro cambios más que no habían sido detectados mediante el análisis de heterodúplex. Dado que cuatro (29%) de los cambios encontrados se localizaron en el exón 10, se decidió continuar el análisis del amplicón de este exón mediante DGGE. Este análisis, permitió detectar dos cambios puntuales que sólo habían sido identificados mediante secuenciación y un polimorfismo intrónico no detectado anteriormente (Tabla 1). No obstante, debido a la complejidad de esta técnica, este tipo de análisis no se aplicó a los restantes exones, completándose el estudio del gen *SLC26A4* mediante la técnica DHPLC. El análisis DHPLC de los 44 casos iniciales detectó 15 mutaciones puntuales que habían sido identificadas previamente, y cuatro nuevos cambios que no fueron detectados en el análisis de heterodúplex (Tabla 1). Este panel de 19 mutaciones puntuales en 11 amplicones diferentes nos permitió optimizar las condiciones del análisis DHPLC. Posteriormente, también mediante análisis DHPLC, se completó el estudio de los 67 pacientes del grupo de riesgo (A, B y C) y se analizaron 168 pacientes sordos del grupo de “no-riesgo” (D), (ver pacientes y metodología).

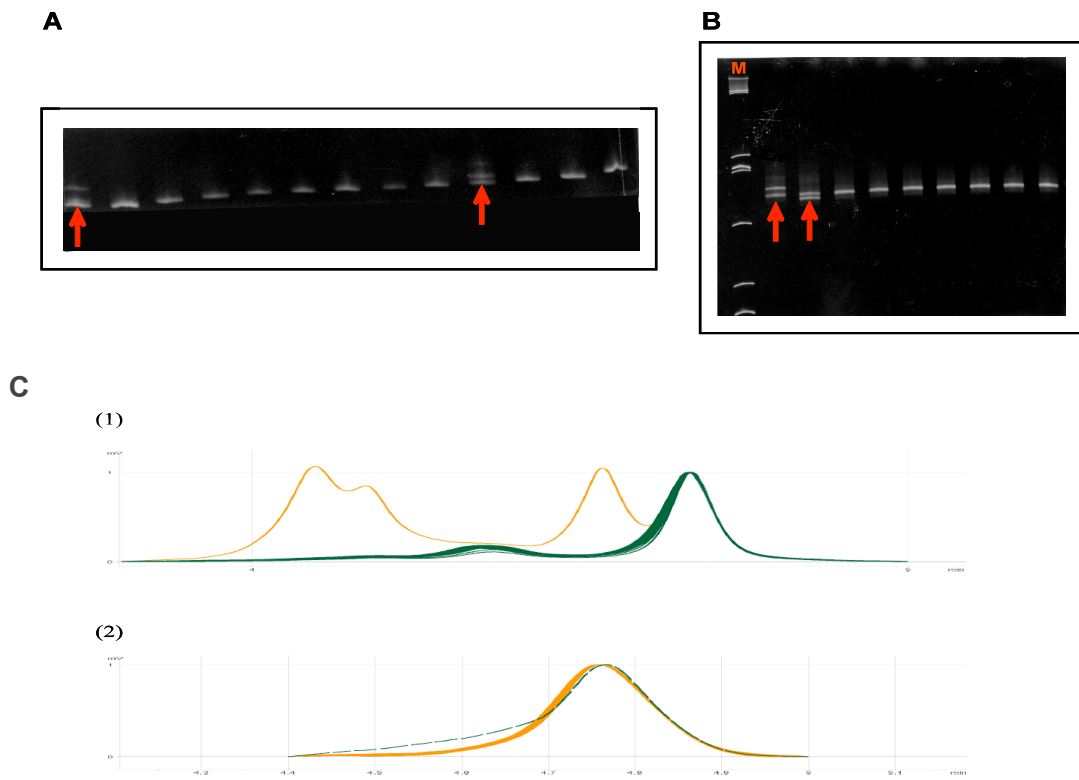


Figura 3. A) Análisis de heterodúplex. B) Análisis mediante DGGE del exón 10 del gen *SLC26A4*. Geles teñidos con bromuro de etidio. Las flechas rojas señalan los amplicones en los que se aprecian las bandas de homodúplex y heterodúplex, indicando la existencia de un cambio en la secuencia amplificada. M, marcador de peso molecular. C) Electroferogramas correspondientes a un análisis mediante DHPLC. (1) Exón 4, individuo mutante en naranja e individuos silvestres en verde. (2) Exón 10, individuo mutante línea verde discontinua y en naranja individuos silvestres.

Aparte de los tres métodos comentados: heterodúplex, DGGE y DHPLC; se puso a punto un método para la detección de mutaciones específicas, mediante el procedimiento de la extensión de cebador (*Primer Extension Analysis*, SNaPshot) (ver pacientes y metodología, apartado 5.1.5). La ventaja de la técnica es que permite el análisis de varias mutaciones de un mismo amplicón o de amplicones diferentes, en un único ensayo. Mediante esta técnica se investigó la presencia/ausencia de 16 cambios del gen *SLC26A4* (Tabla 2), en 195 casos esporádicos con sordera autosómica recesiva. Este análisis no mostró ningún nuevo caso portador de las mutaciones buscadas.

Tabla 1. Variantes alélicas del gen *SLC26A4* detectadas con diferentes técnicas de análisis mutacional.

Exón/Intrón	Cambio de aa	Cambio de nucleótido	Tipo de cambio	Técnicas			
				1	2	3	4
Exón 2	p.E29Q	c.85G>C	Transversión	+	NR	+	+
Exón 3	p.V88I	c.262G>A	Transición	+	NR	+	+
Exón 4	p.V138F	c.412G>T	Transición	+	NR	+	+
Exón 5	p.P140H	c.419C>A	Transversión	+	NR	+	+
Exón 6	p.G209V	c.626G>T	Transición	+	NR	+	+
Exón 10	p.R409H	c.1226G>A	Transición	+	+	+	+
Exón 10	p.T410M	c.1229C>T	Transición	+	+	+	+
Exón 10	p.Q413P	c.1238A>C	Transversión	-	+	+	+
Exón 10	p.T416P	c.1246A>C	Transversión	-	+	+	+
Exón 11	p.G424D	c.1271G>A	Transición	-	NR	+	+
Exón 11	p.L445W	c.1334T>G	Transversión	+	NR	+	+
Exón 13	p.T485R	c.1454C>G	Transversión	+	NR	+	+
Exón 13	p.G497S	c.1468G>A	Transición	+	NR	+	+
Exón 13	p.Q514K	c.1541C>A	Transversión	-	NR	+	+
Exón 19	p.D724G	c.2171A>G	Transición	+	NR	+	+
Exón 10	p.C400FfsX67	c.1197delT	Delección	+	+	+	+
Intrón 8	p.?	c.1001+1G>A	Transición	+	NR	+	+
Intrón 8	p.?	c.1001+5G>T	Transversión	+	NR	+	+
Intrón 9		c.1150-36A>G	Transición	-	+	+	+

(1) Heterodúplex; (2) DGGE; (3) DHPLC; (4) Secuencia. (+) Detectado; (-) no detectado; (NR) no realizado. En negrita, cambios no detectados mediante heterodúplex.

Tabla 2. Alelos *SLC26A4* analizados mediante SnapShot.

GRUPO	MUTACIONES
p1T	p.P140H, p.G424D, c.1197delT, p.T416P
p2T	c.1001+5G>T, p.T485R, p.Q514K, p.R409H
p3T	p.V138F, p.G209V, c.1001+1G>A, p.L445W
p4T	c.279delT, p.T410M, p.Q413P, p.G497S

3. ESPECTRO MUTACIONAL DEL GEN *SLC26A4* EN LA POBLACION SORDA ESPAÑOLA

El análisis mutacional de los 20 exones codificantes del gen *SLC26A4* reveló 47 cambios en 26 pacientes independientes (Tabla 3). De estos 47 cambios, 31 son distintos entre si y todos menos uno son cambios puntuales. Además, 10 cambios no habían sido descritos con anterioridad.

El análisis genético se completó confirmando el origen paterno de los cambios, mediante secuenciación directa de los respectivos progenitores. La detección de portadores entre los restantes miembros de las familias, se realizó mediante análisis de haplotipos con el panel de marcadores polimórficos ligados al locus *SLC26A4*.

3.1. Mutaciones puntuales

En la muestra analizada se detectaron 30 cambios puntuales (Tabla 3), de los cuales 26 ocurren en la secuencia codificante, e incluyen 22 (71%) mutaciones *missense*, un cambio silencioso (p.D710D) y tres deleciones de un nucleótido (*frameshifts*) que cambian la fase de lectura y generan codones de terminación prematuros. Además se identificaron tres mutaciones puntuales que alteran los sitios canónicos de procesamiento (*Splicing*) del mRNA, y otra cuarta (c.1001+5G>T) que, probablemente, también altera el procesamiento del mensajero (ver resultados, apartado 5).

Aunque la mayoría de los cambios fueron hallados en distintos alelos, algunos se identificaron en el mismo. Los cambios [p.V88I; p.R409H] se detectaron en uno de los alelos del paciente S226.1, los dos cambios [p.G740V; p.T307M] en un alelo del individuo S707.1, (Tabla 7) y los tres cambios [p.V609G; p.D710D; p.G740S] en un alelo de un individuo del grupo de “no-riesgo” D.

Casi todos los cambios se identificaron en familias diferentes, siendo p.Q514K la mutación más frecuente, identificada en 6 de los 47 cambios identificados (13%), seguida de p.L445W y c.1001+1G>A, identificadas cada una de ellas en tres casos (6,4%).

3.2. Cambios puntuales en secuencia no codificante

Además de los 30 cambios puntuales indicados anteriormente, se detectaron cinco cambios polimórficos en las secuencias intrónicas: c.1002-9A>C (intrón 8), c.1150-36A>G (intrón 9), c.1545-8delT (intrón 13), c.1708-18T>A (intrón 15) y c.1804-23T>C (intrón 16). También se detectó un cambio en la secuencia no codificante del exón 21, c.2767A>T. El cambio c.1708-18T>A (intrón 15) es muy frecuente detectándose en un tercio del total de pacientes.

Tabla 3. Variantes alélicas del gen *SLC26A4* identificadas en la población española.

Cambio de nucleótido	Exón/ Intrón	cambio de aa	ALELOS MUTADOS ¹				Ref
			Grupo A (n=22)	Grupo B (n=69)	Grupo C (n=36)	Grupo D (n=329)	
c.85G>C	Exón 2	p.E29Q	0	1	0	0	1
c.262G>A	Exón 3	p.V88I	0	1	0	0	
c.412G>T	Exón 4	p.V138F	0	1	1	0	2
c.419C>A	Exón 5	p.P140H	0	0	1	0	
c.626G>T	Exón 6	p.G209V	0	1	0	0	3
c.920C>T	Exón 8	p.T307M	0	0	1	0	4
c.1003T>C	Exón 8	p.F335L	0	1	0	0	1
c.1040C>T	Exón 9	p.S347L	0	0	0	1	
c.1226G>A	Exón 10	p.R409H	0	1	0	0	5
c.1229C>T	Exón 10	p.T410M	1	0	0	0	5
c.1238A>C	Exón 10	p.Q413P	1	0	0	0	
c.1246A>C	Exón 10	p.T416P	2	0	0	0	5
c.1271G>A	Exón 11	p.G424D	1	0	0	0	
c.1334T>G	Exón 11	p.L445W	1	2	0	0	6
c.1454C>G	Exón 13	p.T485R	1	0	0	0	
c.1468G>A	Exón 13	p.G497S	0	0	1	0	7
c.1541C>A	Exón 13	p.Q514K	1	3	1	1	
c.1826T>G	Exón17	p.V609G	0	0	0	2	13
c.2130C>T	Exón 19	p.D710D	0	0	0	1	14
c.2171A>G	Exón 19	p.D724G	1	0	0	1	8
c.2218G>A	Exón 19	p.G740S	0	0	0	2	8
c.2219G>T	Exón 19	p.G740V	0	0	1	1	4
c.2326C>T	Exón 21	p.R776C	0	0	0	1	13
c.279delT	Exón 3	p.T94WfsX87	1	0	0	0	9
c.1197delT	Exón 10	p.C400FfsX67	2	0	0	0	10
c.1238delA	Exón 10	p.Q413RfsX54	0	0	1	0	
c.416-1G>A	Intrón 4	p.?	1	0	0	0	11
c.1001+1G>A	Intrón 8	p.?	0	2	1	0	5
c.1001+5G>T	Intrón 8	p.?	1	0	0	0	
c.1614+1G>A	Intrón 14	p.?	0	1	0	0	12
g.8091T_22145Cdel	Intrón 3-6	p.G102DfsX4	1	0	0	0	

¹Numero de alelos independientes identificados en individuos españoles; (n) número de alelos analizados; los cambios encontrados en este trabajo se indican en negrita; (Ref) primera publicación: (1) Campbell et al., 2001; (2) van Hauwe et al., 1998; (3) Usami et al., 1999; (4) Albert et al., 2006; (5) Coyle et al., 1998; (6) Cremers et al., 1998; (7) Li et al., 1998; (8) Prasad et al., 2004; (9) Kopp et al., 1999; (10) Everett et al., 1997; (11) Palos et al., 2008; (12) Fugazzola et al., 2002; (13) Pryor et al., 2005; (14) Prasad comunicación personal (Pendred/Bor Homepage, <http://www.healthcare.uiowa.edu/labs/pendredandbor/>).

3.3. Caracterización de una mutación de novo p.Q413P

Tal y como se indica en el apartado 1, el análisis de haplotipos de la familia E343 reveló incompatibilidad de ligamiento (Figura 4). *A priori*, este resultado indicaba que la enfermedad en dicha familia no estaba ligada al locus *DFNB4*, sin embargo, el análisis mutacional del caso índice de dicha familia reveló dos mutaciones del gen *SLC26A4*: p.L445W (Cremers et al., 1998) en el exón 11, y p.Q413P (Pera et al., 2008a) en el exón 10. El alelo p.L445W (c.1334T>G) se identificó también en la madre y la hermana del paciente, sin embargo, la mutación p.Q413P (c.1238A>C) no se encontró en el DNA de los progenitores, ni en el de la hermana normo-oyente que compartía haplotipos con el caso índice (Figura 4). Después de excluir una posible falsa paternidad (ver apartado 4.2 métodos), procedimos a la amplificación del fragmento genómico que incluía las posiciones de las dos mutaciones, c.1238A>C y c.1334T>G, mediante una PCR de amplio rango, a partir del DNA del paciente. Se clonaron los productos PCR y se caracterizaron los clones recombinantes, determinando los genotipos para los marcadores *D7S3312* y *D7S2459* localizados en el intrón 10, y secuenciando los exones 10 y 11 incluidos en el producto PCR (Figura 5). Este análisis mostró la existencia de clones con el genotipo paterno *D7S3312* de 190 pb, la mutación c.1238A>C en el exón 10 y el alelo silvestre del exón 11. También se identificaron otros clones con el alelo materno *D7S3312* de 194 pb, el silvestre del exón 10 y la mutación c.1334T>G del exón 11. Estos resultados demostraron que p.Q413P es una mutación *de novo* que ocurre en el alelo paterno, además comprobamos que las dos mutaciones *missense* identificadas en el paciente E343.1 ocurren en *trans*, afectando ambos alelos, confirmandose el patrón de herencia recesiva de la sordera PS/"EVA no sindrómica" (*DFNB4*).

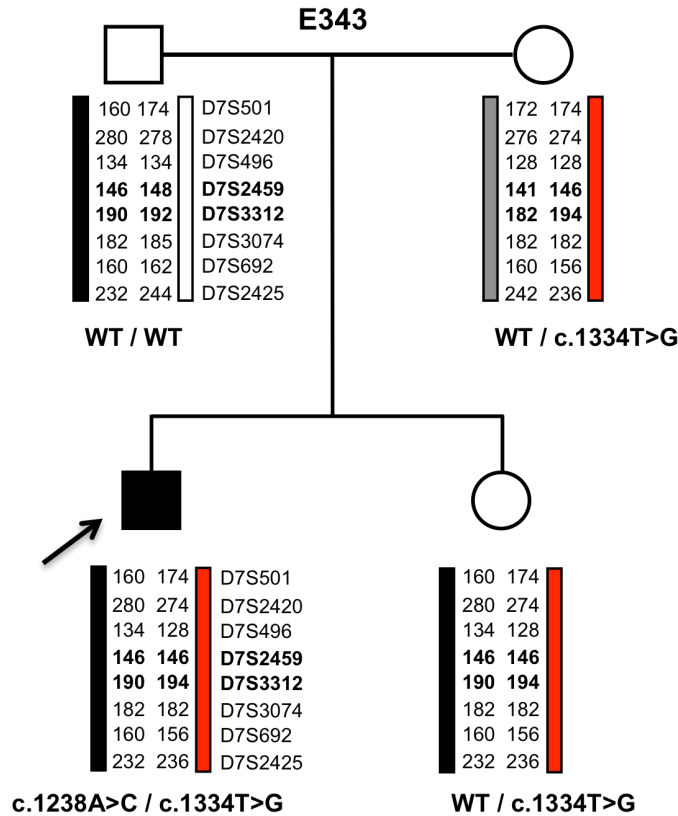


Figura 4. Análisis de haplotipos de la familia E343 con seis marcadores microsatélite flanqueando al gen *SLC26A4* (*D7S501*, *D7S2420*, *D7S496*, *D7S3074*, *D7S692* y *D7S2425*) y dos marcadores microsatélite intragénicos localizados en el intrón 10 (*D7S24259* y *D7S3312*), los números indican el tamaño de los alelos en pares de bases. Las mutaciones *SLC26A4* identificadas en cada miembro de la familia se muestran en la base de las barras. WT, alelo silvestre. La flecha indica el caso índice.

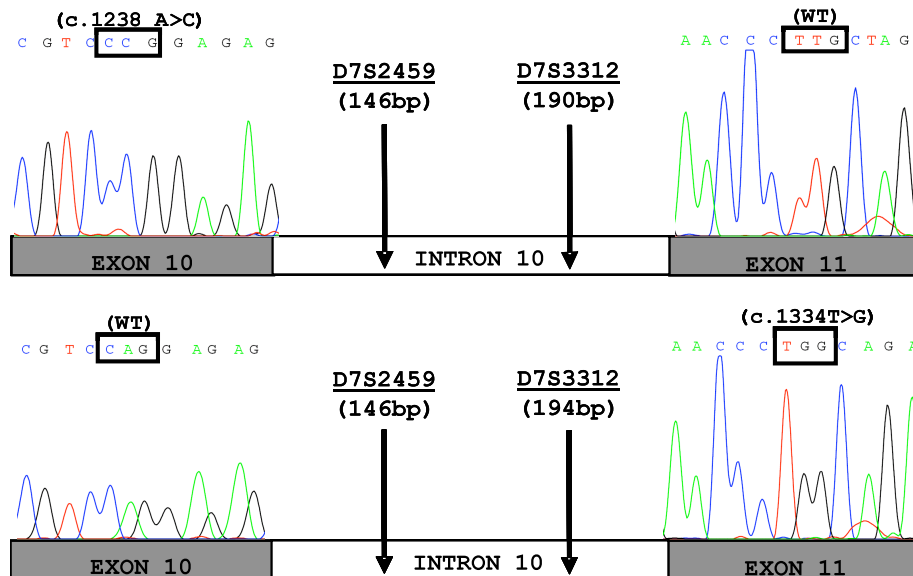


Figura 5. Análisis genético de los clones recombinantes derivados del paciente. Las barras representan los fragmentos genómicos clonados. Los electroferogramas de secuencia muestran los alelos silvestres y mutantes. Los tamaños de los marcadores intragénicos, *D7S24259* y *D7S3312*, se muestran en pares de bases.

Para la detección rápida de la mutación c.1238A>C (p.Q413P) se diseñó un ensayo que consiste en la amplificación PCR del fragmento genómico correspondiente y posterior digestión enzimática, con la endonucleasa *Msp* I, del producto de amplificación (ver apartado 6.2 métodos y Figura 6). El estudio de la muestra de pacientes afectados de sordera (A, B, C, D), no mostró ningún otro caso con dicha mutación.

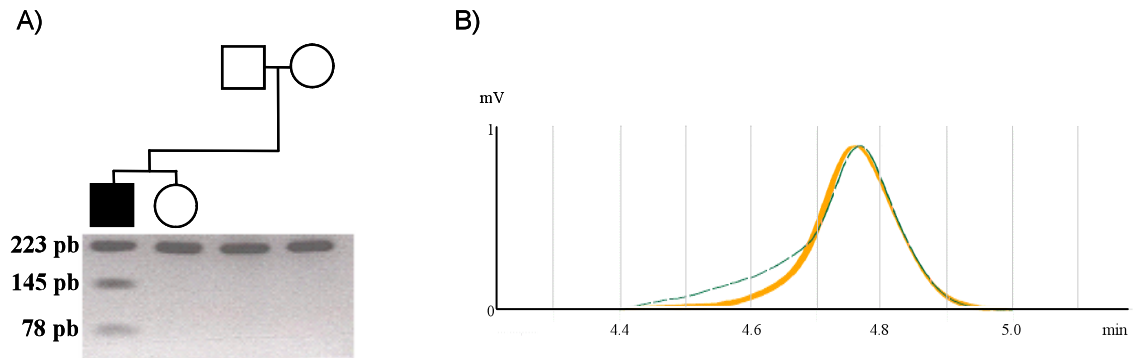


Figura 6. Test genético para la detección de la mutación c.1238A>C. A) Análisis de digestión enzimática con *Msp* I, del producto PCR del exón 10, en los miembros de la familia E343. La fragmentación del producto PCR revela la presencia de la mutación. El tamaño de los fragmentos está indicado en pares de bases a la izquierda. B) Análisis por DHPLC del exón 10. Cromatogramas normalizados de DNAs silvestres (líneas naranjas) comparados con la muestra del paciente (línea discontinua).

3.4. Estudio del origen evolutivo de la mutación p.Q514K

De las 31 variantes alélicas encontradas en nuestra muestra de familias españolas (n=235), encontramos 6 alelos independientes p.Q514K en 5 familias (Tabla 3). En el caso índice de la familia E224, la mutación p.Q514K se identificó en homocigosis (Tabla 7). Dado que no existían evidencias de consanguinidad, se consideraron dos alelos independientes.

Para investigar un posible efecto fundador para esta mutación, se determinó el genotipo de los seis alelos p.Q514K. Tras el correspondiente análisis de haplotipos, se observó una asociación de dicha mutación con el haplotipo 132 (*D7S496*)-146 (*D7S2459*)-190 (*D7S3312*)-182 (*D7S3074*) (Tabla 4). Además, el genotipado de 62 cromosomas sanos, con los marcadores *D7S496*, *D7S2459*, *D7S3312* y *D7S3074*, no mostró ningún caso portador de dicho haplotipo (132-146-190-182). Según el test de Fisher, las diferencias entre los dos grupos son significativas ($p < 0,0001$). Este análisis indica que los 6 alelos portadores de la mutación p.Q514K derivan de un ancestro común.

Tabla 4. Análisis de haplotipos de los cromosomas p.Q514K.

	MICROSATELITES							Cromosomas españoles	
Haplotipos	<i>D7S501</i>	<i>D7S2420</i>	<i>D7S496</i>	<i>D7S2459</i>	<i>D7S3312</i>	<i>D7S3074</i>	<i>D7S692</i>	p.Q514K (n=6)	Control (n=64)
1	170	276	132	146	190	182	164	1	0
2	168	276	132	146	190	182	164	1	0
3	168	276	132	146	190	182	157	3	0
4	172	284	132	146	190	182	164	1	0
Haplotipo fundador	<div> <div>132</div> <div>146</div> <div>190</div> <div>182</div> </div>							6	0

El tamaño de los alelos se indica en pb. El orden relativo y la distancia física entre los marcadores STR son los siguientes: Cen-*D7S501* (450 kb)-*D7S2420* (265 kb)-*D7S496* (176 kb)-*D7S2459* (0.4 kb)-*D7S3312* (260 kb)-*D7S3074* (748 kb)-*D7S692*-Tel. Los marcadores *D7S2459* y *D7S3312* son intragénicos.

3.5. Deleción intragénica

El método de análisis del gen *SLC26A4* empleado en este estudio no permite detectar posibles deleciones de uno o más exones que pudieran ocurrir en heterocigosis. Aunque el análisis de haplotipos con los 8 marcadores STR ligados al locus *DFNB4*, no reveló pérdida de heterozigosidad (LOH) en ninguna de las familias estudiadas, no descartamos la existencia de dichas deleciones intragénicas.

Tras el análisis mutacional del gen *SLC26A4*, no se consiguió identificar el segundo alelo mutado en dos familias, S129 y E595, de los grupos de riesgo A y B respectivamente. La familia S129 consta de padre y madre normo-oyentes, y dos hijos afectados de PS que heredan por vía paterna la mutación p.T485R (Figura 7). Investigamos la existencia de deleciones intragénicas genotipando 17 SNPs, distribuidos a lo largo del gen *SLC26A4*, en los cuatro miembros de la familia S129 (Figura 8). La mayoría de los SNPs estudiados (12) no resultaron informativos, sin embargo, con el polimorfismo rs2712212 (intrón 6) se observó pérdida de la carga alélica materna en ambos hermanos. Aunque los dos SNPs situados en el intrón 8 no fueron informativos, tanto la mutación p.T485R en el exón 10, como los SNPs rs2188561, rs982915 y rs2712207 (intrones 12, 14 y 19) mostraron presencia de carga alélica paterna y materna, por tanto se supuso que la LOH del polimorfismo del intrón 6 podría estar asociada a una deleción que abarcaba, al menos, desde el intrón 6 al intrón 9.

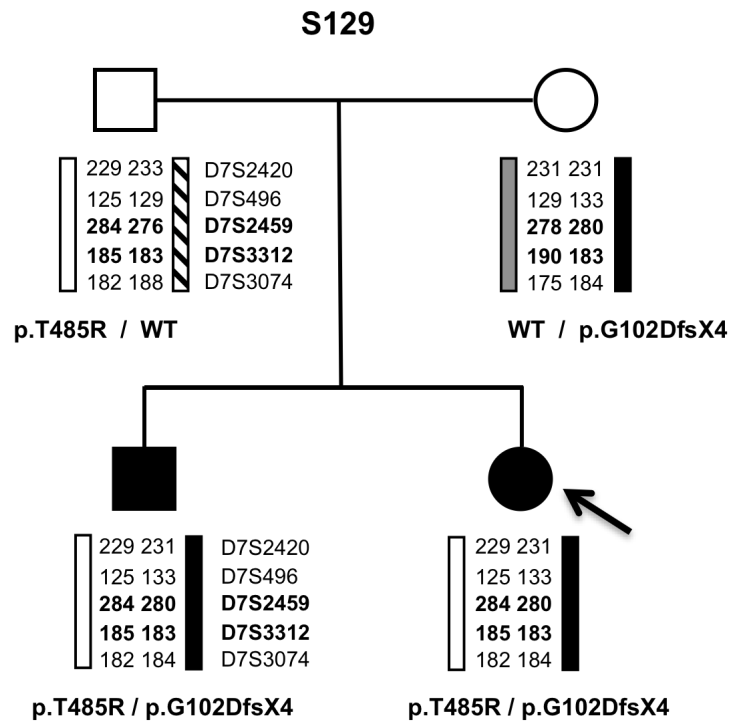
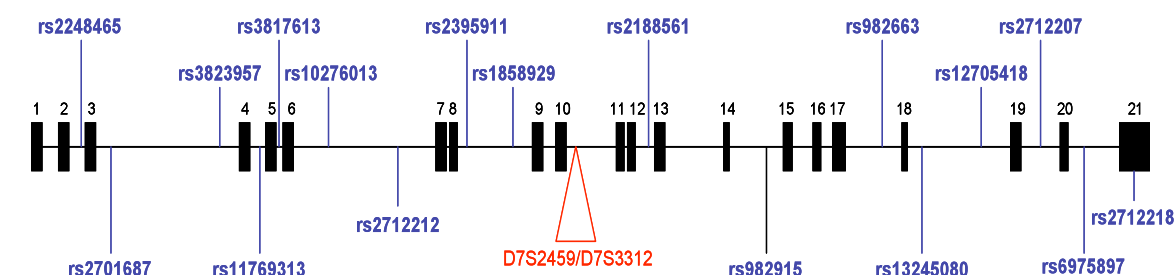


Figura 7. Análisis de haplotipos de la familia S129 con tres marcadores microsatélite flanqueando al gen *SLC26A4* (*D7S2420*, *D7S496* y *D7S3074*) y dos marcadores microsatélite intragénicos localizados en el intrón 10 (*D7S24259* y *D7S3312*). Los números indican el tamaño de los alelos en pares de bases y las mutaciones *SLC26A4*, identificadas en cada miembro de la familia, se muestran en la base de las barras. WT, alelo silvestre. La flecha indica el caso índice.

Para poder confirmar estos resultados, analizamos la dosis génica de la región 5' del gen *SLC26A4* (exones 1-10), mediante PCR a tiempo real (ver pacientes y metodología, apartado 5.1.6). La cuantificación absoluta de los 10 amplicones en la madre y los dos hijos afectados, mostró reducción de la dosis génica en los amplicones de los exones 4-6, ambos inclusive, en los tres sujetos. Como se puede observar en la Figura 9, en el exón 3, el DNA de la madre (S129.2) y el del control normo-oyente (C102) mostraron valores de Ct (*Cycle threshold*) muy similares entre sí, correspondientes a la concentración de DNA analizada (50ng y 100ng) según la curva de calibrado (pds3). Sin embargo, en el exón 4, los valores de Ct obtenidos con el DNA materno se corresponden a concentraciones de DNA inferiores (25ng y 50ng) a las analizadas (50ng y 100ng), lo que demuestra la reducción de la dosis génica.



Individuo	rs2248465		rs2701687	rs3823957	rs11769313	rs3817613	rs10276013
S129.1	C / T		C / T	G / G	A / A	G / G	G / G
S129.2	C / T		C / T	G / G	A / A	G / G	G / G
S129.3	T / T		T / T	G / G	A / A	G / G	G / G
S129.4	T / T		T / T	G / G	A / A	G / G	G / G
Individuo	rs2712212		rs2395911	rs1858929	rs2188561	rs982915	rs982663
	A	B					
S129.1	T / T	A / G	T / T	G / G	C / A	A / G	A / A
S129.2	A / A	A / A	T / T	G / G	C / C	A / G	A / A
S129.3	T	G	T / T	G / G	A / C	A / G	A / A
S129.4	T	G	T / T	G / G	A / C	A / G	A / A
Individuo	rs13245080		rs12705418	rs2712207	rs6975897	rs2712218	
S129.1	G / G		G / G	A / G	C / C	G / G	
S129.2	A / G		G / G	G / G	C / T	G / G	
S129.3	G / G		G / G	A / G	C / C	G / G	
S129.4	G / G		G / G	A / G	C / C	G / G	

Figura 8. Posición en el gen *SLC26A4* de los 17 SNPs seleccionados a partir de la base de datos del NCBI y genotipo de la familia S129. En azul los 17 SNPs seleccionados de la base de datos del NCBI. En rojo los marcadores microsatélite intragénicos (*D7S2459* y *D7S3312*). S129.1, padre; S129.2, madre; S129.3, hija; S129.4, hijo. En negrita y subrayado, pérdida de heterocigosidad (LOH) del marcador rs2712212 en los individuos S129.3 y S129.4.

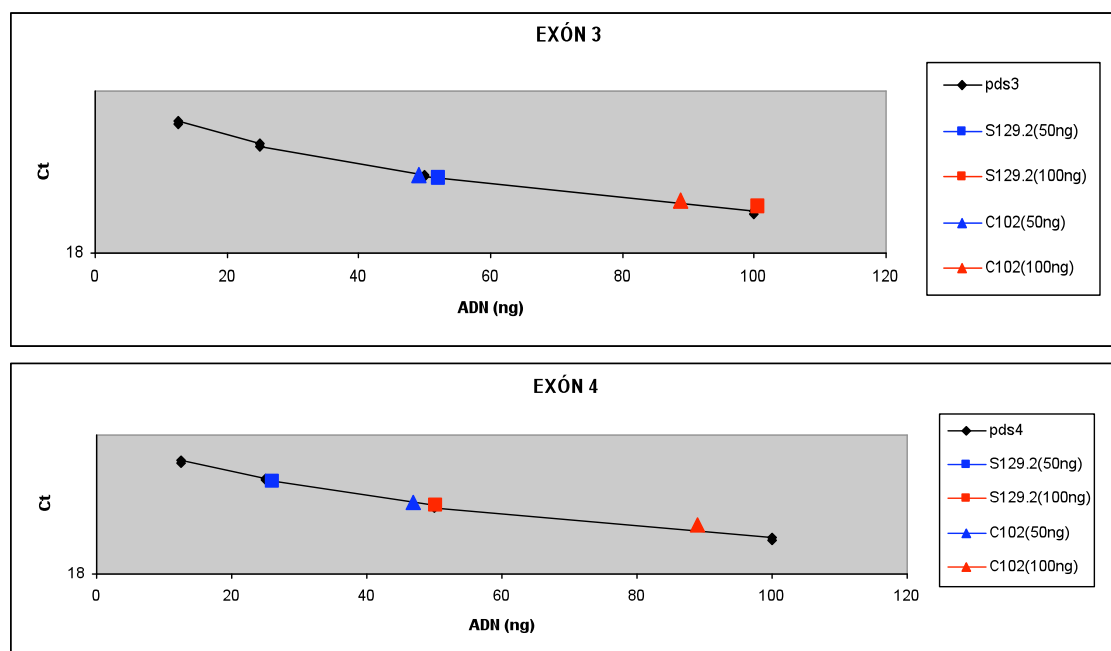


Figura 9. Análisis cuantitativo mediante PCR a tiempo real. Gráficas correspondientes al análisis de los exones 3 y 4 del gen *SLC26A4*. pds3 y pds4, curvas de calibrado realizadas con un DNA control; S129.2, DNA de la madre; C102, DNA de un individuo normo-oyente.

Para caracterizar los puntos de rotura de la delección, se realizó una amplificación PCR del fragmento genómico que comprende desde el intrón 2 al 7, utilizando como molde DNA de la madre. El producto PCR resultante mostró un tamaño de 6 kb, muy inferior al correspondiente del alelo silvestre (20 kb), (Figura 10). En análisis físico del producto PCR (6 kb) con varias enzimas de restricción nos permitió definir con mayor precisión la localización de los puntos de rotura. El fragmento no presentaba dianas de restricción para las enzimas *Bam*HI y *Cla*I, y tenía un punto de corte para la endonucleasa *Bgl*II (ver Figura 10A). Según estos resultados se diseñaron dos cebadores situados en los intrones 3 y 7, y se realizó una segunda amplificación, obteniéndose el fragmento de unión de 2 kb (Figura 10B). La secuenciación directa de dicho fragmento nos permitió determinar los puntos de rotura de la delección (Figura 11A).

La delección abarca desde el nucleótido g.8091 (intrón 3) al g.22145 (intrón 6), (NT_007933), eliminando 14052 pb del gen *SLC26A4*. Esta delección cambia la fase de lectura a partir del residuo p.G102 y genera un codón parada tres aminoácidos después (X105).

Conocidos los puntos de rotura, para facilitar la detección de la delección g.8091T_22145Cdel en otros individuos, se diseñó un test PCR específico (ver pacientes y metodología, apartado 5.1.6). Este ensayo produce un fragmento de 314 pb resultante de la amplificación del alelo delecionado, mientras que el alelo silvestre no genera ningún producto de amplificación por su elevado tamaño (Figura 10C). El análisis de la muestra total de pacientes (n = 235) —grupos A, B, C, y D—, no mostró ningún otro caso con dicha delección.

Para investigar el origen de la delección, se realizó un análisis *in silico* de las regiones genómicas adyacentes a los puntos de rotura (intrones 3 y 6), mediante el programa Repeat Masker. Dicho análisis reveló la presencia de varios elementos repetitivos que presentaban diferentes homologías respecto a las secuencias consenso, en ambos intrones (Tabla 5), pero ninguno de ellos se encontraba localizado en los puntos de rotura de la delección (Figura 11A). Tampoco se encontró homología de secuencia entre ambos puntos de rotura, 5' y 3', descartando la recombinación homóloga desigual como mecanismo causante de la delección.

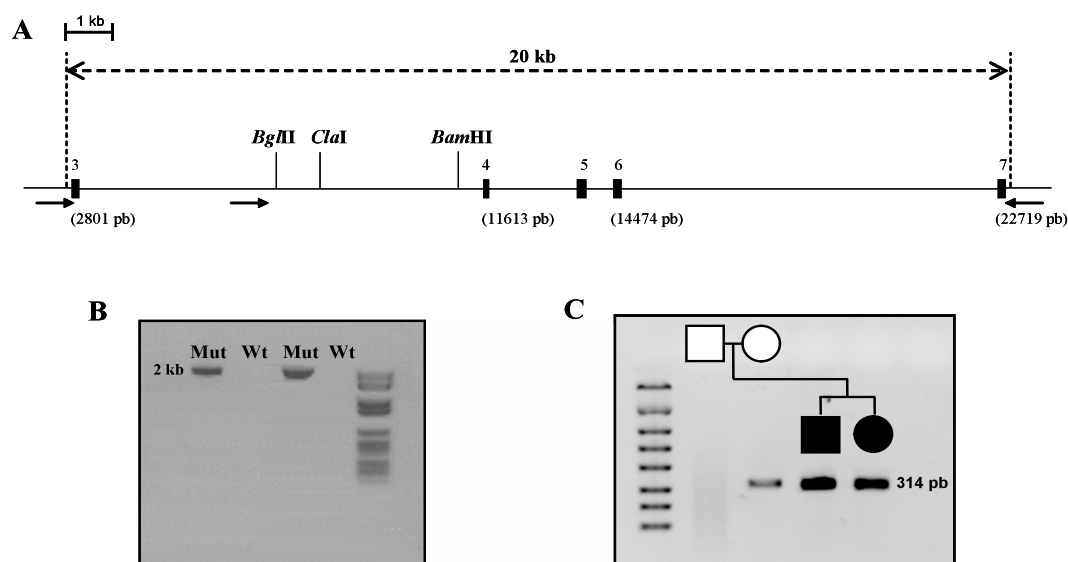


Figura 10. A) Representación de un fragmento del gen *SLC26A4*, abarcando desde el intrón 2 al 7. Las flechas indican los cebadores de los ensayos PCR. Los números entre paréntesis, hacen referencia a la secuencia genómica del gen *SLC26A4* (NT_007933). B) Electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, mostrando el producto PCR de 2 kb del individuo mutante (Mut) y ausencia de amplificación en el individuo control (Wt). C) Electroforesis en gel de agarosa 1,5% mostrando el producto de 314 pb en la madre y los hijos de la familia S129.

Tabla 5. Elementos repetitivos detectados en los intrones 3 y 6 del gen *SLC26A4* (NT_007933).

REPETICION	CLASE / FAMILIA	POSICION		TAMAÑO (pb)	HOMOLOGIA CON <i>SLC26A4</i>
		Comienzo	Final		
AluY	SINE / Alu	g.3045	g.3348	303	91,4 %
AluSx	SINE / Alu	g.3582	g.3897	315	83 %
AluJb	SINE / Alu	g.5587	g.5887	300	85,7 %
L2	LINE / L2	g.6238	g.7947	1709	49,2 %
AluSx	SINE / Alu	g.8335	g.8622	287	78,8 %
AluSg1	SINE / Alu	g.9479	g.9772	293	90 %
AluJo	SINE / Alu	g.10529	g.10826	297	80,1 %
MER47A	DNA / MER2_type	g.11093	g.11453	360	85,3 %
AluJb	SINE / Alu	g.14928	g.15236	308	91,2 %
AluJb	SINE / Alu	g.16254	g.16545	288	80,9 %
AluJo	SINE / Alu	g.17415	g.17722	307	77 %
AluJo	SINE / Alu	g.21168	g.21492	324	57,3 %

Para identificar otras secuencias que pudieran haber favorecido la aparición de la deleción, se buscaron motivos asociados con translocaciones y grandes deleciones, en la proximidad de los puntos de rotura (± 15 pb) (Abeyasinghe et al., 2003). Se identificaron 7 sitios consenso de corte para la Topoisomerasa I (CTT, GTT, AAT y GAT), dos de los cuales (GTT y AAT) estaban localizados en los puntos de rotura 5' y

3' respectivamente (Figura 11A). El análisis de la región delecionada, mediante el programa MAR-Wiz, mostró que el punto de rotura 3' está próximo a un S/MAR (*Scaffold attachment/matrix-associated region*), con un alto potencial MAR (Figura 11B).

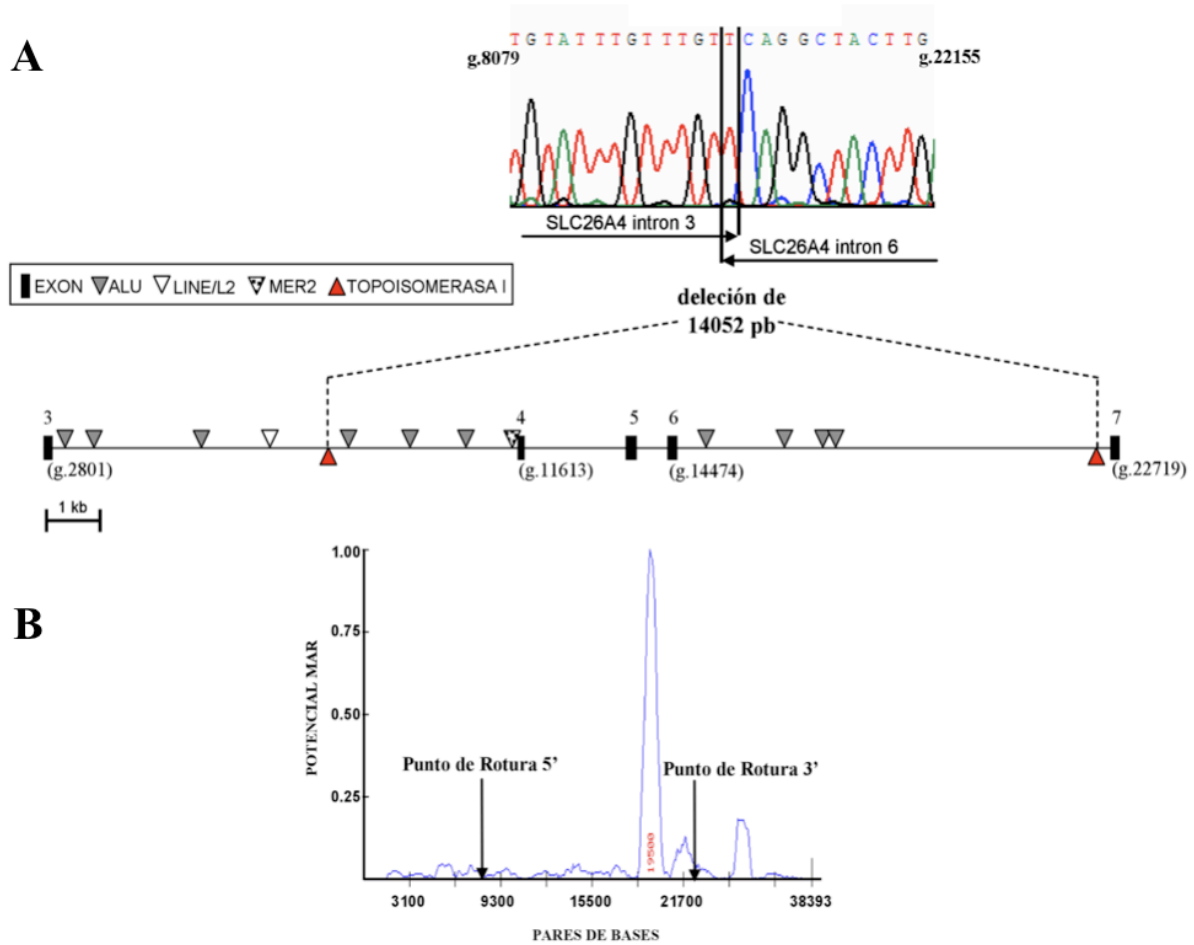


Figura 11. Análisis *in silico* de los puntos de rotura de la deleción g.8091-22145del. A) Representación de un fragmento del gen *SLC26A4* desde el exón 3 al 7, mostrando los elementos repetitivos detectados en los intrones 3 y 6. Panel superior, electroferograma correspondiente a la secuencia del punto de rotura de la deleción. B) Representación gráfica del potencial MAR de un fragmento del gen *SLC26A4*, desde el exón 1 al 14, que contiene los puntos de rotura de la deleción. Todas las posiciones se refieren a la secuencia genómica del gen *SLC26A4* (NT_007933).

4. VARIANTES ALELICAS DEL GEN *SLC26A4* EN INDIVIDUOS NORMO-OYENTES

Uno de los criterios utilizados para establecer la naturaleza patogénica de las mutaciones *missense* es su baja incidencia en una muestra de población control. Con este fin, teniendo en cuenta el elevado número de mutaciones *missense* identificadas en la muestra de pacientes, decidimos realizar un análisis de toda la secuencia codificante del gen *SLC26A4*, utilizando la técnica DHPLC, en una muestra de 214 individuos españoles con audición normal. En este análisis se identificaron 17 cambios que incluyen: 5 polimorfismos intrónicos, un cambio en la secuencia no codificante del exón 21 (c.2498A>T), dos cambios conservativos (p.L75L y p.D710D) y 9 variantes *missense* localizadas a lo largo de la secuencia codificante del gen *SLC26A4* (Tabla 6). Sorprendentemente, 8 de los 9 cambios *missense* habían sido publicados previamente como mutaciones causantes de enfermedad. La mayoría de dichas mutaciones *missense* fueron identificadas tanto en individuos control como en pacientes, de la población española, salvo tres de ellas (p.F354S, p.L597S y p.F667C) que no se encontraron en la muestra de pacientes analizada (n=235) (Tabla 6). Los cambios fueron hallados en distintos alelos, a excepción de p.V609G, p.D710D, y p.G740S que fueron identificados en *cis* en el mismo cromosoma de un individuo control. No se encontró ningún individuo normo-oyente homocigoto o heterocigoto compuesto para dichos cambios.

Tabla 6. Variantes alélicas *SLC26A4* identificadas en población normo-oyente española.

Cambio de nucleótido	Cambio de aa	Exón/Intrón	Controles (n=428)	Pacientes (n=456)	Publicación
c.85G>C	p.E29Q	Exón 2	1	1	Campbell 2001, Prasad 2004, Blons 2004, Shears 2004, Albert 2006
c.225C>G	p.L75L	Exón 3	1	0	Nueva
c.262G>A	p.V88I	Exón 3	1	1	Pera 2008a
c.1061T>C	p.F354S	Exón 9	3	0	Blons 2004, Albert 2006
c.1790T>C	p.L597S	Exón 16	1	0	Campbell 2001, Fugazzola 2002, Blons 2004, Pryor 2005, ¹Albert 2006
c.1826T>G	p.V609G	Exón 17	2	2	¹ Pryor 2005, Albert 2006,
c.2000T>G	p.F667C	Exón 17	1	0	Everett 1997
c.2130C>T	p.D710D	Exón 19	1	2	¹ Prasad comunicación personal
c.2171A>G	p.D724G	Exón 19	2	2	Prasad 2004, Arellano 2005
c.2218G>A	p.G740S	Exón 19	1	2	Prasad 2004
c.2326C>T	p.R776C	Exón 21	1	1	Pryor 2005, ¹ Hutchin 2005, ¹ Pfarr 2006
c.1-32G>A	-	Intrón 1	1	0	Nueva
c.165-32A>G	-	Intrón 2	1	0	Nueva
c.601-17C>T	-	Intrón 5	3	0	Nueva
c.1708-18T>A	-	Intrón 15	16	>16	Nueva
c.2320-22T>C	-	Intrón 20	5	0	Nueva
c.2498A>T	-	Exón 21	1	0	Nueva

En negrita los cambios identificados únicamente en individuos control. (n) Número de alelos independientes analizados; ¹publicaciones en que el cambio es considerado un polimorfismo no patogénico.

5. VALIDACION DE LOS CAMBIOS PUNTUALES IDENTIFICADOS EN EL GEN *SLC26A4*

5.1. Mutaciones *missense*

Para establecer la patogenicidad de este tipo de mutaciones se siguieron dos criterios habituales: (i) la conservación del residuo afectado en las proteínas de los genes ortólogos *SLC26A4* y (ii) la baja incidencia del cambio en individuos normo-oyentes de la misma población.

Los cambios *missense* p.P140H, p.Q413P, p.S347L, p.G424D, p.T485R y p.Q514K, identificados por primera vez en nuestra muestra de pacientes, afectan a residuos conservados en ortólogos (Figura 12) y no se detectaron en controles (428 cromosomas). Por tanto, es muy probable que dichos cambios sean mutaciones causantes de enfermedad.

Otro de los nuevos cambios, p.V88I, caracterizado en un alelo de un paciente, en *cis* con p.R409H, fue identificado también en un alelo de un sujeto control, en este caso sin la mutación p.R409H. El residuo p.V88 esta poco conservado en los genes ortólogos, siendo más común en dicha posición, la existencia de isoleucina en lugar de valina (Figura 12). La exigua conservación del residuo p.V88 y el hallazgo del cambio p.V88I en un individuo normo-oyente sugieren que dicho cambio no es patogénico sino, más bien, debe tratarse de un polimorfismo de baja frecuencia.

En la muestra de pacientes sordos se identificaron otros 15 cambios *missense*, publicados previamente (Tabla 3). Nueve de estas mutaciones no se detectaron en individuos control y afectan a residuos muy conservados en ortólogos, por lo que parecen ser mutaciones patogénicas. Sin embargo, los cambios p.V609G, p.G740V, p.G740S y p.R776C afectan a residuos poco conservados en los ortólogos *SLC26A4* (Figura 12) y todos menos p.G740V fueron detectados en individuos normo-oyentes españoles (Tabla 6). Los cambios p.V609G y p.G740S, aparecen en la base de datos de SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) del NCBI (rs17154335 y rs17154353). La variante p.R776C, aunque ha sido considerada patogénica por algunos autores (Pryor et al., 2005), fue también identificada en individuos control del Reino Unido (Hutchings et al., 2005) y, en un estudio funcional, se confirmó que dicho cambio no afectaba al flujo de I^- celular (Pfarr et al., 2006). Estos resultados indican que los cuatro cambios (p.V609G, p.G740V, p.G740S y p.R776C) son polimorfismos de baja frecuencia que muy probablemente no afectan a la funcionalidad de la proteína.

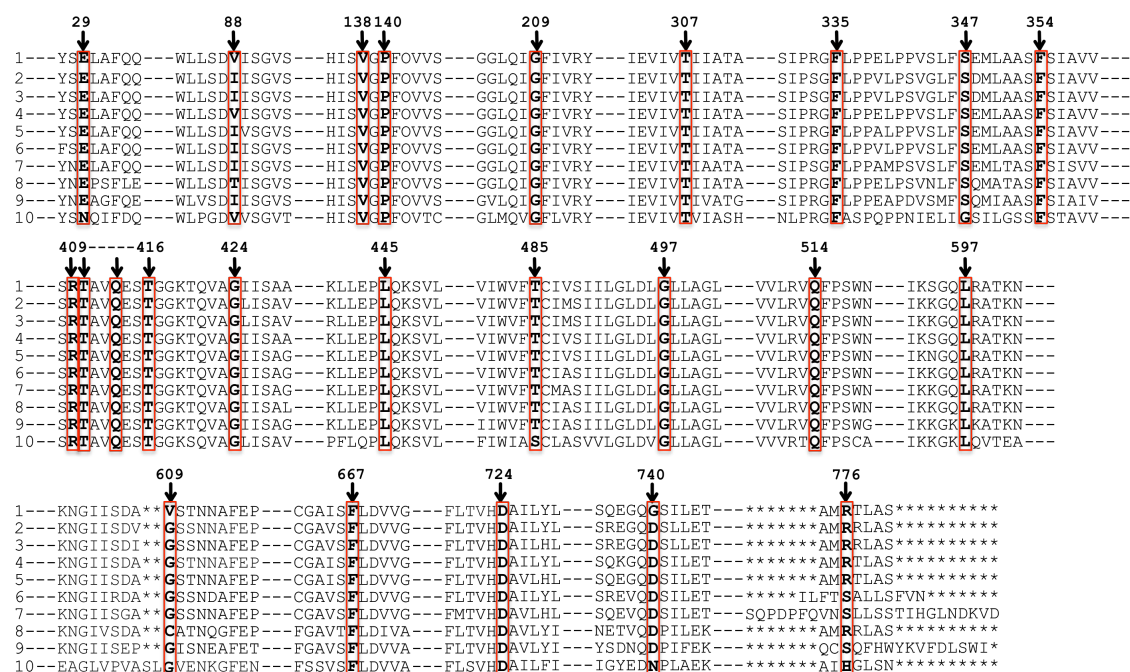


Figura 12. Conservación de los residuos p.29, p.88, p.140, p.209, p.307, p.335, p.347, p.354, p.409, p.410, p.413, p.416, p.424, p.445, p.485, p.497, p.514, p.597, p.609, p.667, p.724, p.740 y p.776, en las proteínas ortólogas SLC26A4 de: (1) *H. sapiens* (NP_000432), (2) *R. norvegicus* (NP_062087), (3) *M. musculus* (NP_035997), (4) *P. troglodytes* (XP_519308), (5) *M. mulata* (XP_001094049), (6) *C. familiaris* (XP_540382), (7) *B. taurus* (XP_608706), (8) *M. domestica* (XP_001363598), (9) *G. gallus* (XP_425419) y (10) *D. rerio* (XP_692273). *, Indica los huecos.

Aparte de los polimorfismos referidos anteriormente, otros dos cambios p.E29Q y p.D724G, fueron identificados en la muestra de afectados, en uno y dos casos respectivamente. Dos de dichos pacientes eran heterocigotos compuestos portadores de los alelos p.E29Q y p.D724G, y un segundo alelo mutado, el tercer paciente, un sujeto del grupo D, portaba un único alelo mutado p.D724G. Los dos cambios fueron también detectados en individuos control heterocigotos, en el mismo número de casos, uno p.E29Q (0,23%) y dos casos p.D724G (0,47%) (Tabla 6). Ambos cambios afectan a residuos muy conservados. En concreto, el residuo p.E29 está conservado en todos los ortólogos *SLC26A4*, salvo en *D. rerio*; y el residuo p.D724, está totalmente conservado en todos los ortólogos (Figura 12). Dichas variantes han sido descritas anteriormente como causantes de enfermedad (Campbell et al., 2001; Prasad et al., 2004). La ocurrencia de estos cambios en la población control, plantea una duda razonable sobre su naturaleza (cambio patogénico o polimorfismo).

Por otra parte, en nuestro grupo de población control identificamos tres cambios *missense* que no se encontraron en la muestra de pacientes analizada (p.F354S, p.L597S y p.F667C). Los tres afectan a residuos totalmente conservados en los

ortólogos *SLC26A4* (Figura 12). Los cambios p.F354S y p.F667C no han sido identificados en otros grupos de individuos normo-oyentes de origen caucásico; mientras que el cambio p.L597S fue identificado en cuatro de 50 individuos control de la población francesa (Albert et al., 2006). Los autores sugieren que, p.L597S, pudiera ser un polimorfismo.

5.2. Mutaciones que alteran el procesamiento del mRNA

El cambio c.416-1G>A (intrón 4) es una transición que afecta al sitio aceptor para el *splicing* del exón 5, los cambios c.1001+1G>A y c.1001+5G>T ocurren en el intrón 8 y supuestamente afectan al sitio donador para el *splicing* del exón 8, por último, la transición c.1614+1G>A (intrón 14) afectaría al sitio donador para el *splicing* del exón 14. Intentamos confirmar el efecto de dichos cambios sobre el procesamiento del mRNA, mediante un análisis RT-PCR. Esto no fue posible, probablemente, por la reducida expresión del gen *SLC26A4* en sangre periférica. Por tanto, para valorar la naturaleza patogénica de estos cuatro cambios, utilizamos dos programas de predicción de sitios de *splicing* (ver pacientes y metodología, apartado 12). Utilizando el programa BDGP se comprobó que la mutación c.416-1G>A anula completamente el sitio aceptor para el *splicing* del exón 5, creándose un aceptor nuevo en la posición adyacente (Figura 13). Sin embargo, la funcionalidad de este nuevo aceptor es menor (0,80) que la del aceptor silvestre (0,97). Así mismo, las mutaciones c.1001+1G>A y c.1614+1G>A destruyen los sitios donadores para el *splicing* de los exones 8 y 14 respectivamente. En el caso del cambio c.1001+5G>T, aunque no se destruye el sitio donador predicho para el *splicing* del exón 8, su funcionalidad disminuye de 0,98 a 0,21 en el mutante. El programa ESEfinder confirmó dichas predicciones.

SILVESTRE

tcacagctaaatcttttatacatTTTTAAACCCtatgcagacacattgaacatttgtgattaataactgattaattgtagagactTTTTCCCC**ag**gacctttcc
agtggtagtTTAATGGTGGGatctgtgttctgagcatggccccgacgaacactttctcgtatccagcagaatggaactgtattaataactactatgata
gacactgcagctagagatacagctagagtctctgattgccagtgccctgactctgctggttgaattatacag

c.416-1G>A

tcacagctaaatcttttatacatTTTTAAACCCtatgcagacacattgaacatttgtgattaataactgattaattgtagagactTTTTCCCC**ag**gacctttcc
agtggtagtTTAATGGTGGGatctgtgttctgagcatggccccgacgaacactttctcgtatccagcagaatggaactgtattaataactactatgata
gacactgcagctagagatacagctagagtctctgattgccagtgccctgactctgctggttgaattatacag

Figura 13. Secuencias silvestre y mutante correspondientes al final del intrón 4 y todo el exón 5. Recuadro sombreado, exón 5; las flechas indican la posición c.416-1G en la secuencia silvestre y c.416-1A en la mutante; en negrita y amarillo el sitio aceptor correspondiente a cada secuencia.

5.3. Mutaciones que alteran la fase de lectura

La delección c.1238delA genera un cambio en la fase de lectura creándose un codón terminación prematuro 54 amino ácidos después (p.Q413RfsX54). En el caso de la delección c.279delT, se genera un cambio en la fase de lectura a partir del amino ácido p.T94 que causa un codón parada 87 residuos después (p.T94WfsX87). Por último, la delección de una Timina en la posición c.1197 cambia la fase de lectura desde el amino ácido p.C400 y crea un codón parada después de 67 residuos (p.C400FfsX67). Ninguna de estas mutaciones se encontró en 214 individuos normo-oyentes y puesto que todas ellas generan codones de parada prematuros, no dudamos de su naturaleza patogénica.

6. ANALISIS MUTACIONAL DEL GEN *FOXII*

El gen *FOXII* (también conocido como *FKHL10*), es el homólogo humano de *Foxi1* y se localiza en la región cromosómica 5q32-34 (Larsson et al., 1995). Este gen comprende 3,8 kb de DNA genómico y se compone de dos exones, ambos codificantes. Tal como se ha explicado en la introducción (ver apartado 3.4), *FOXII* es un activador transcripcional del gen *SLC26A4*.

En cuatro de los 12 casos con PS (grupo A), no identificamos ninguna mutación en la secuencia codificante del gen *SLC26A4*, ni en las secuencias FSB1 y FSB2 (exón 1). También, en un individuo con sordera y EVA unilaterales (grupo B) sólo se detectó un alelo *SLC26A4* mutado. Por lo tanto, se investigó la posible existencia de mutaciones en el gen *FOXII* en dichos individuos. El análisis, mediante secuencia directa, de los exones 1 y 2 de dicho gen no reveló ninguna mutación en ninguno de los pacientes analizados.

7. ESTUDIO FUNCIONAL DE CAMBIOS *MISSENSE* EN EL GEN *SLC26A4*

Para obtener datos más fidedignos sobre la naturaleza patogénica de los cambios *missense* identificados en la población española, se realizó un estudio funcional de algunos de ellos. Específicamente se analizaron los cambios p.P140H, p.Q413P, p.G424D, p.T485R y p.Q514K identificados exclusivamente en individuos sordos, los cambios p.E29Q, p.V88I, p.D724G detectados en individuos sordos y en normo-oyentes; el doble mutante p.V88I/p.R409H identificado en un individuo sordo y el

cambio p.L597S identificado únicamente en individuos control (ver resultados, apartado 5.1).

Para el análisis funcional de dichas variantes alélicas del gen *SLC26A4* se utilizó un método fluorométrico rápido, basado en la propiedad de los iones haluro de extinguir (*quenching*) la fluorescencia de la proteína EYFP (ver pacientes y metodología, apartado 11). Este método ha sido validado, recientemente, para el análisis funcional de la pendrina (Dossena et al., 2006b).

En primer lugar, para generar clones recombinantes de cada una de las variantes alélicas se realizó una mutagénesis dirigida del vector bicistrónico pIRES2-EYFP-PDS (ver pacientes y metodología, apartado 9). Tras obtener los clones recombinantes, se transfectaron las células y se realizó el análisis funcional (ver pacientes y metodología, apartados 10 y 11). En cada experimento se analizaron paralelamente células transfectadas con pIRES2-EYFP-PDSwt (control silvestre) y células transfectadas con pIRES2-EYFP (control vacío), (Figura 14).

Las graficas muestran las variaciones de la intensidad de fluorescencia en las células transfectadas, en función del tiempo (Figura 14). En el control silvestre, cuando sustituimos la solución rica en Cl^- por la rica en I^- (**transición A→B**), se observa un descenso de la fluorescencia asociado a la entrada de dicho ión al interior celular que se explica por el hecho de que el I^- es más eficaz que el Cl^- en el proceso de *quenching* de la fluorescencia. Cuando cambiamos de nuevo a una solución rica en Cl^- (**transición B→C**), podemos ver como las células recuperan la fluorescencia ya que el I^- es transportado al exterior celular por la pendrina. Sin embargo, en el control vacío, en la **transición A→B** no se observa una disminución de la fluorescencia, es decir, el I^- no entra en la célula, tampoco hay aumento de fluorescencia significativo en la **transición B→C**, indicando que no hay transporte de I^- al exterior celular.

La variación de la fluorescencia expresada en valores relativos ($\Delta F\%$; ver pacientes y metodología, apartado 11), calculada del conjunto de registros del mismo plásmido, obtenidos en varios experimentos, se muestra en la figura 15. Se comprueba que la expresión de la pendrina silvestre conlleva una marcada disminución de la fluorescencia ($\Delta F\% = -10,5 \pm 0,7$) en el cambio Cl^-/I^- (Figura 15A), o aumento ($\Delta F\% = 16,8 \pm 1,0$) en el cambio I^-/Cl^- (Figura 15B), lo cual indica existencia de flujo de I^- en ambas direcciones. Dado que el I^- es capaz de silenciar la señal de EYFP más eficazmente que el Cl^- , el leve aumento de la fluorescencia observado en el control vacío subraya el hecho de que la salida de Cl^- prevalece a la entrada de I^- .

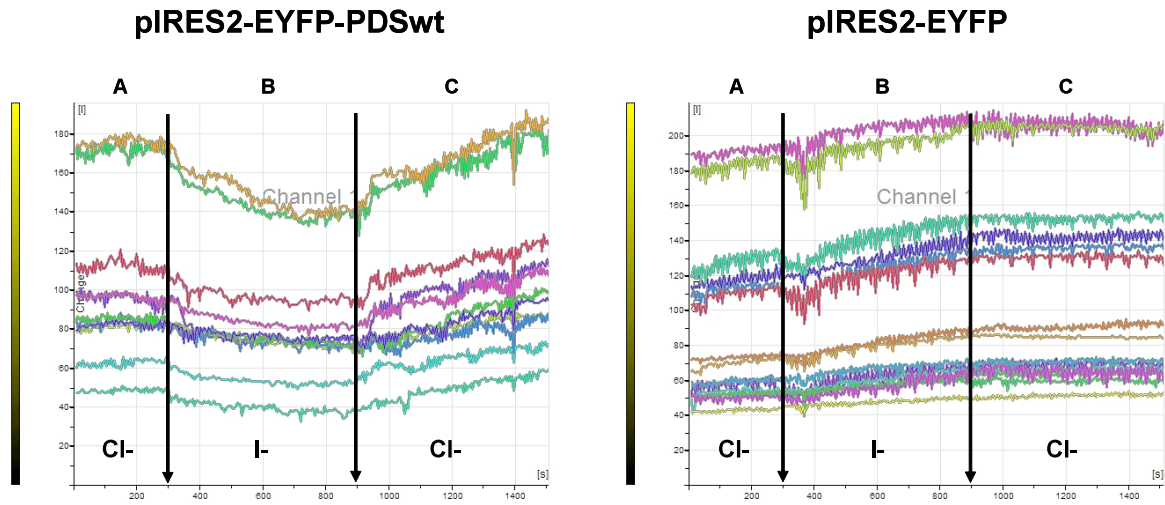
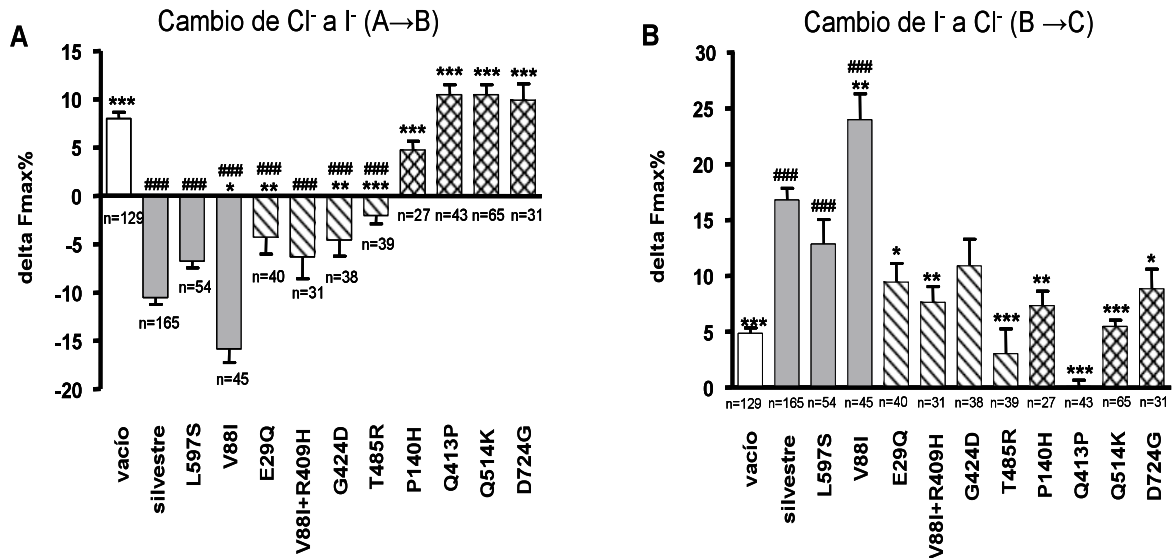


Figura 14. Representación gráfica de la intensidad de la fluorescencia con respecto al tiempo en células transfectadas con: pIRES2-EYFP-PDSwt (control silvestre) y pIRES2-EYFP (control vacío). Cada traza de color se corresponde con una región de interés (ROI) situada dentro una célula distinta, en un mismo experimento. Las flechas indican los cambios de solución. **A**, 5 minutos en una solución rica en Cl^- ; **B**, 10 minutos en una solución rica en I^- ; **C**, 10 minutos en una solución rica en Cl^- . Imagen obtenida del microscopio confocal.



*** $p < 0.001$ vs silvestre	### $p < 0.001$ vs vacío
** $p < 0.01$ vs silvestre	## $p < 0.01$ vs vacío
* $p < 0.05$ vs silvestre	# $p < 0.05$ vs vacío

Figura 15. Resultados del test ANOVA utilizado para el análisis funcional de los alelos *SLC26A4*. A) Transición A→B. B) Transición B→C; n= número de células o ROIs. En gris proteínas funcionales, a rayas proteínas “parcialmente funcionales”, a cuadros proteínas no funcionales y en blanco el control vacío.

Con las proteínas mutantes se observaron tres tipos de respuesta (ver figura 15). El grupo de mutantes p.P140H, p.Q413P, p.D724G y p.Q514K mostró un comportamiento similar al control vacío, concluimos por tanto que son proteínas no funcionales. Los mutantes p.E29Q, p.G424D y p.T485R poseen cierta actividad transportadora (proteínas “parcialmente funcionales”), mostrando valores de *quenching* de la fluorescencia significativamente diferentes a los de los controles silvestre y vacío. Las proteínas mutantes p.L597S y p.V88I transportan I⁻, en ambas direcciones, de manera similar o mejor que el control silvestre; por tanto son proteínas funcionales. El doble mutante p.V88I/p.R409H mostró un patrón de funcionalidad similar al de los tres mutantes “parcialmente funcionales”, y aunque los valores de *quenching* de la fluorescencia no mostraron diferencias significativas al compararlos con los del control silvestre, la comparación con los valores derivados del mutante p.V88I sí arrojó diferencias significativas.

8. ANALISIS DE LA RELACION GENOTIPO-FENOTIPO EN PACIENTES CON MUTACIONES EN EL GEN *SLC26A4*

En este apartado, analizamos tres aspectos diferentes de la relación entre el genotipo y el fenotipo de los pacientes.

En primer lugar se ha valorado la posible relación existente entre la presencia de un único alelo mutado (casos “monoalélicos”) o dos alelos (casos “bialélicos”) y el fenotipo: PS o “EVA no sindrómico” (ver introducción, apartado 2.2). Tras el análisis mutacional del gen *SLC26A4*, encontramos que el 67% (8/12 casos independientes) de los pacientes afectados de PS (grupo A) eran “bialélicos”; mientras que sólo el 17% (6/35 casos independientes) de los pacientes con sordera “EVA no sindrómica” (grupo B) tenían dicho genotipo. En el grupo C, integrado por 20 casos familiares con sordera autosómica recesiva no sindrómica ligada a *DFNB4*, se identificaron dos mutaciones *SLC26A4* únicamente en 4 casos familiares independientes, que representan el 20% del total (4/20) (Tabla 7). En el grupo de “no riesgo” (D, n=168) no identificamos ningún caso “bialélico”. La revisión clínica (TAC) de cuatro pacientes “bialélicos” del grupo C (S9.3, S9.4, S461.3 y S461.4), pertenecientes a dos grupos familiares, mostró la existencia de malformaciones del oído interno, EVA con o sin malformación de

Mondini, en todos ellos. También se nos informó que otro de los pacientes (S471.2) del grupo C, portador de dos alelos mutados, a la edad de 29 años, ya padecía de bocio (tabla 7). Por otra parte, en la muestra analizada (n=235), sólo hallamos cuatro casos “monoalélicos”: uno del grupo B (E595.1) y tres del grupo D. En el grupo A no se identificó ningún caso “monoalélico”. Ninguno de los pacientes “monoalélicos” presentaba signos característicos de las sorderas *DFNB4* (PS y “EVA no sindrómica”). El paciente E595.1 presentaba, desde su nacimiento, sordera (cofosis) unilateral asociada a EVA, también unilateral. Por último, ninguno de los tres pacientes “monoalélicos” del grupo D, presentaba malformaciones del oído interno ni alteraciones del tiroides (Tabla 7). Es muy probable que estos tres casos sean portadores casuales de mutaciones en el gen *SLC26A4* y que su sordera esté causada por mutaciones en otros loci. De hecho, en dos de las tres familias mencionadas, (S662 y S1206), se encontró incompatibilidad de ligamiento al locus *DFNB4* (datos no mostrados). Según estos resultados, las dos sorderas ligadas al locus *DFNB4*, están causadas por la inactivación de ambos alelos del gen *SLC26A4*.

En segundo lugar, el estudio genético muestra la existencia de casos no ligados (sin mutación), en ambos tipos de sordera. La frecuencia de casos PS ligados al locus *SLC26A4* (67%) —casos “bialelicos”— es significativamente superior ($p<0,009$) a la frecuencia de casos de sordera “EVA no sindrómica” ligados a dicho locus (17%). Es posible que la frecuencia de casos PS ligados al locus *SLC26A4* sea superior a la referida anteriormente, según se deduce de la revisión clínica de los pacientes. En el grupo A, no se identificó ninguna mutación ni en el gen *SLC26A4* ni en *FOXI1*, en cinco pacientes de cuatro familias PS. Cabe denotar que los pacientes (S353.3, S353.4, E67.2, y E412.1) de tres de las familias sin mutaciones, presentaban valores de descarga en el test del perclorato de 12-16% que se aproximan al umbral normal (10%). Algunos autores consideran que sólo valores de descarga superiores al 15% deben ser considerados positivos (Pryor et al., 2005). Además, ninguno de dichos pacientes presentaba bocio o alteración de la función tiroidea (niveles normales de T4 y TSH). Por otra parte, el análisis de haplotipos de la familia E67 mostró incompatibilidad de ligamiento al locus *DFNB4* (Figura 2). El quinto paciente (S665.1) sin mutaciones, a la edad de 7 años, presentaba sordera unilateral moderada en el oído derecho y malformación unilateral (EVA+Mondini) en el mismo oído, con un resultado positivo del test del perclorato (47%). En el PS la presentación unilateral tanto de la sordera como de la malformación del oído interno es poco frecuente y discutida (Pryor et al.,

2005). En nuestra serie, todos los pacientes “bialélicos” presentan malformaciones tipo EVA en ambos oídos. Según estas consideraciones, y teniendo en cuenta la ausencia de mutaciones *SLC26A4* en todos ellos, el diagnóstico clínico inicial de PS debería de ser reconsiderado. Por lo tanto, la frecuencia de casos PS ligados al locus *DFNB4*, en nuestra serie, podría estar próxima al 100%. Sin embargo, en 28 de los 35 casos independientes (80%) con sordera “EVA no sindrómica” no se identificó ninguna mutación en el gen *SLC26A4*. En 12 de estos casos se comprobó la ausencia de alteración en la mineralización del tiroides, según los valores negativos (descarga <10%) del test de perclorato. Además, el análisis de haplotipos de una de estas familias (S346) mostró incompatibilidad de ligamiento al locus *DFNB4* (Figura 2, resultados). Según estos resultados, la sordera “EVA no sindrómica” es genéticamente heterogénea y, en nuestra serie, la mayoría de los casos no están ligados al locus *DFNB4*.

El tercer aspecto a considerar, es la posible relación entre las diferentes mutaciones *SLC26A4* y el fenotipo de las sorderas —sindrómico y no sindrómico—. El resultado más relevante es la existencia de varios casos familiares donde encontramos diferencias fenotípicas notables entre hermanos. El ejemplo más ilustrativo de este fenómeno es la familia S154, donde cuatro individuos sordos portadores de la misma mutación en homocigosis, p.T410M, muestran fenotipos relativos a la glándula tiroidea completamente diferentes (Tabla 7). En concreto, los pacientes S154.1 (53 años) y S154.2 (61 años) no presentaban bocio y sus niveles en suero de las hormonas T4 y TSH eran normales; mientras que sus hermanos S154.3 y S154.4 padecían de bocio, siendo uno de ellos (S154.3) hipotiroideo. El test de perclorato de dichos pacientes (S154.3 y S154.4) únicamente resultó positivo en el caso S154.3 (Arellano et al, 2005). Los resultados claramente demuestran que la misma mutación en homocigosis, causa tanto PS como “EVA no sindrómico”. También observamos variabilidad fenotípica entre los dos hermanos afectados de la familia S129. Ambos pacientes son heterocigotos compuestos para las mutaciones p.T485R y p.G102DfsX4, sin embargo, el caso índice (S129.3) presentaba en la última revisión (22 años), sordera profunda y bocio; mientras que su hermano (S129.4, 17 años) poseía una hipoacusia leve-moderada sin afectación del tiroides (Tabla 7). Por otra parte, los dos pacientes de la familia S145, heterocigotos compuestos para las mutaciones p.C400FfsX67 y p.Q514K, presentaban bocio y alteración de la función tiroidea, sin embargo mostraban diferencias importantes en el grado de su hipoacusia (Tabla 7). Una situación similar se encontró en la familia S938, donde el hermano menor de tres años, presentaba hipoacusia profunda mientras que el

mayor, con 6 años, mostraba hipoacusia moderada, portando ambos las mismas mutaciones *SLC26A4* en heterocigosis compuesta (p.F335L/p.L445W) (Tabla 7). Por tanto, según las consideraciones anteriores, no parece existir una relación directa entre el genotipo y el fenotipo de las sorderas *SLC26A4*. No obstante, si comparamos el efecto de las mutaciones que truncan la proteína con el de las mutaciones missense, encontramos que dos pacientes pertenecientes a la familia S283 portadores de la delección c.279delT (p.T94WfsX87) en homocigosis, presentan el fenotipo más grave (cofosis bilateral y EVA) con respecto a la hipoacusia (Tabla 7).

Se ha descrito que la sordera ligada al locus *DFNB4* es progresiva, por lo tanto, valoramos la posibilidad de que el grado de sordera encontrado en los pacientes pudiera relacionarse con las diferencias de edad. El conjunto de pacientes con dos mutaciones *SLC26A4* se dividió en dos grupos, en función del grado de sordera: un primer grupo integrado por 24 individuos con sordera profunda-severa, con una edad media de 28 ± 22 años (rango de edad 2-69); y un segundo grupo de 8 pacientes con sordera grave-leve y una edad media de 14 ± 13 años (rango de edad 3-44). Aunque el grupo de pacientes con sordera más grave muestra mayor edad, el análisis estadístico de los datos, mediante el test de Fisher, indica que la comparación no es significativa ($p=0,6$). Igualmente, analizamos la posible relación entre la afectación del tiroides y la edad de los pacientes. Para este análisis, se consideraron únicamente los pacientes con dos alelos *SLC26A4* mutados, en los que se comprobó la existencia de malformaciones bilaterales del oído interno, un total de 29 casos (16 del grupo A, 9 del B y 4 del C). De estos, sólo 10 individuos (grupo A) presentan bocio. La edad media de los pacientes con bocio es 40 ± 17 años (rango de edad 18-69 años) y la edad media de los casos sin bocio es 21 ± 18 años (rango de edad 2-61 años). A pesar de la elevada dispersión de la muestra, el análisis de los datos mediante el test de Fisher muestra la existencia de diferencias significativas entre la edad de los pacientes que habían desarrollado bocio y la de los que no presentaban dicha alteración ($p=0,007$). Este resultado confirma que la edad de los pacientes es un factor implicado en la aparición del bocio.

Tabla 7. Genotipo y fenotipo de pacientes españoles con mutaciones en el gen *SLC26A4*.

FAM	GENOTIPO		CASO	EDAD	FENOTIPO			
	Alelo paterno	Alelo materno			Hipoacusia	CT	Bocio	¹ TP
S129	p.T485R	p.G102DfsX4	S129.3	22	Profunda, bilateral	EVA	SI (ET)	P
	p.T485R	p.G102DfsX4	S129.4	17	O.D. leve/O.I. moderada	EVA	NO (ET)	NR
S145	p.C400FfsX67	p.Q514K	S145.3	21	O.D. moderada /O.I. grave	EVA	SI (HT)	NR
	p.C400FfsX67	p.Q514K	S145.5	18	Profunda, bilateral	EVA	SI (HT)	P
S154 ^c	p.T410M	p.T410M	S154.1	61	Profunda, bilateral	EVA	NO (ET)	NR
	p.T410M	p.T410M	S154.2	53	Profunda, bilateral	EVA	NO (ET)	NR
	p.T410M	p.T410M	S154.3	62	Profunda, bilateral	EVA	SI (HT)	P
	p.T410M	p.T410M	S154.4	59	Profunda, bilateral	EVA	SI (ET)	N
	p.T410M	p.D724G	S154.18	14	O.D. profunda /O.I. grave	MONDINI	NO (ET)	NR
S256	p.G424D	p.T416P	S256.4	22	Profunda, bilateral	MONDINI	SI (HT)	NR
	p.G424D	p.T416P	S256.5	24	Profunda, bilateral	MONDINI	SI (HT)	NR
S283 ^c	p.T94WfsX87	p.T94WfsX87	S283.1	69	Cofosis, bilateral	EVA	SI (ET)	P
	p.T94WfsX87	p.T94WfsX87	S283.2	64	Cofosis, bilateral	EVA	SI (ET)	N
S670	p.C400FfsX67	c.1001+5G>T	S670.1	3	Grave, bilateral, mixta	MONDINI	NO (ET)	32%
E343	p.Q413P	p.L445W	E343.1	7	Moderada, bilateral, progresiva	MONDINI	NO (ET)	18%
E697	c.416-1G>A	p.T416P	E697.1	37	Profunda, bilateral	MONDINI	SI (HT)	NR
S353 ^c	-	-	S353.3	8	Moderada, bilateral, mixta	MONDINI (unilateral)	NO (ET)	15%
	-	-	S353.4	8	Moderada, bilateral, mixta	MONDINI	NO (ET)	12%
S665	-	-	S665.1	7	O.D. moderada /O.I. audición normal	MONDINI (O.D.)	NO (ET)	47%
E67	-	-	E67.2	15	O.D. grave /O.I. moderada	EVA	NO (ET)	12%
E412	-	-	E412.1	17	O.D. grave /O.I. moderada	EVA	NO (ET)	16%
S67	p.G209V	p.Q514K	S67.3	8	Grave, bilateral	EVA	NO	NR
	p.G209V	p.Q514K	S67.4	4	Grave, bilateral	EVA	NO	NR
S226	p.E29Q	[p.V88I; p.R409H]	S226.1	44	O.D. moderada /O.I. leve	EVA	NO	NR
S938	p.F335L	p.L445W	S938.1	6	Moderada, bilateral	EVA	NO	NR
	p.F335L	p.L445W	S938.2	3	Profunda, bilateral	EVA	NO	NR
S1040	c.1001+1G>A	c.1001+1G>A	S1040.1	14	Profunda, bilateral	EVA	NO	NR
	c.1001+1G>A	c.1001+1G>A	S1040.3	6	Profunda, bilateral	EVA	NO	NR
E22	p.L445W	c.1614+1G>A	E22.2	24	Profunda, bilateral	MONDINI	NO	NR
E224	p.Q514K	p.Q514K	E224.3	2	Profunda, bilateral	EVA	NO (ET)	NR
E595	p.V138F	-	E595.1	Recién nacido	O.D. audición normal/O.I. cofosis	EVA (O.I.)	NO	NR
S9	p.P140H	p.G497S	S9.3	6	Profunda, bilateral	MONDINI	NO	NR
	p.P140H	p.G497S	S9.4	4	Profunda, bilateral	MONDINI	NO	NR
S461	p.Q514K	p.V138F	S461.3	22	Profunda, bilateral	EVA	NO	NR
	p.Q514K	p.V138F	S461.4	19	Profunda, bilateral	EVA	NO	NR
S471 ^c	c.1001+1G>A	c.1001+1G>A	S471.2	29	Profunda, bilateral	NR	SI	NR
	c.1001+1G>A	c.1001+1G>A	S471.3	25	Profunda, bilateral	NR	NO	NR
S707	[p.T307M; p.G740V]	p.Q413RfsX54	S707.1	7	Profunda, bilateral	NR	NO	NR
S662	p.S347L	-	S662.1	32	Moderada, bilateral	NORMAL	NO	NR
S1206	p.Q514K	-	S1206.1	1	Profunda, bilateral	NORMAL	NO	NR
E205	p.D724G	-	E205.1	2	Grave, bilateral	NORMAL	NO	NR

La edad, en años, se refiere al momento del diagnóstico clínico. Abreviaturas: FAM, familias; C, familias consanguíneas; O.D., oído derecho; O.I., oído izquierdo; CT; tomografía computerizada; EVA, acueducto vestibular dilatado; Mondini, EVA y displasia de la cóclea (malformación de Mondini); HT, hipotiroideo; ET, eutiroideo; NR, no realizado; TP, test de perclorato. ¹El porcentaje indica los niveles de descarga de I⁻; P, descarga mayor del 10%; N, descarga menor del 10%. Sombreado en gris familias del grupo D.

DISCUSSION

Las sorderas o hipoacusias hereditarias presentan una gran heterogeneidad genética, para mejorar su diagnóstico molecular, en nuestro laboratorio se viene desarrollando un estudio sobre la epidemiología genética de las sorderas más prevalentes, en la población española. En este marco se encuadra el trabajo objeto de esta tesis, centrado en la investigación de las sorderas ligadas al locus *DFNB4*; el síndrome de Pendred y la sordera “EVA no sindrómica”. En el momento que iniciamos este trabajo se había identificado, como responsable de dichas hipoacusias, el gen *SLC26A4* que codifica una proteína denominada pendrina, y se habían descrito unas 60 variantes alélicas causantes de enfermedad. Sin embargo, en la mayoría de los estudios genéticos un importante porcentaje de los pacientes con fenotipo PS y/o “EVA no sindrómico” (*DFNB4*) presentaban una o ninguna mutación en dicho gen (Coyle et al., 1998; Usami et al., 1999; Reardon et al., 2000; Campbell et al., 2001). Como explicación a este hecho, algunos autores plantean la posibilidad de que existan mutaciones en el gen *SLC26A4* sin detectar, como son grandes deleciones de uno o más exones, mutaciones en el promotor, etc.; otros postulan una herencia digénica, como por ejemplo *SLC26A4/FOXI1*.

Por otro lado, no existían estudios moleculares que proporcionaran datos sobre la prevalencia de la sordera *SLC26A4*, en las distintas poblaciones. Únicamente se había publicado un estudio relativo a la prevalencia del síndrome de Pendred, basado en datos clínicos (Fraser 1965).

1. ESPECTRO MUTACIONAL DEL LOCUS *DFNB4* EN LA POBLACION ESPAÑOLA

Para el análisis mutacional del gen *SLC26A4*, hemos ensayado distintas técnicas, con la finalidad de encontrar la que nos aporte mayor sensibilidad y fiabilidad. El análisis de Heterodúplex ha resultado ser la menos efectiva (80%; detectó 14 de los 19 cambios encontrados) y el DGGE pese a ser eficaz (6/6), no ha resultado rentable debido a su complejidad. La técnica más fiable y rápida con la que se completó el estudio, ha sido el DHPLC que nos ha permitido resolver el 100% (35/35) de los cambios puntuales identificados en nuestra muestra de pacientes españoles (en regiones codificantes y no codificantes del gen).

En este trabajo se han caracterizado genéticamente un total de 330 familias españolas no relacionadas que incluyen 499 individuos con hipoacusia. En primer lugar, se realizó un análisis de compatibilidad de ligamiento al locus *DFNB4* mediante el cual

se excluyeron 95 familias. El análisis mutacional del gen *SLC26A4* incluyó 235 casos índice, pertenecientes a dichas familias. También se realizó el análisis mutacional del gen *SLC26A4* de 214 individuos normo-oyentes españoles que constituyen nuestra población control.

El análisis del gen *SLC26A4* en la población española —pacientes y controles—, reveló 35 variantes alélicas que incluyen: 25 (71%) cambios tipo *missense*, dos (6%) cambios conservativos, tres (9%) mutaciones que alteran la fase de lectura de la proteína (deleciones de un aminoácido), cuatro (11%) mutaciones que alteran el *splicing* del mRNA y una (3%) deleción multiexónica que elimina 14 kb del gen (Tabla 1). En total se identificaron 62 alelos *SLC26A4* mutados en 41 de los 449 individuos analizados.

Tabla 1. Variantes alélicas *SLC26A4* identificadas en la población española (pacientes y controles)

MISSENSE	CONSERVATIVO	FRAMESHIFT	SPLICING	DELCION INTRAGENICA
p.E29Q p.V88I p.V138F p.P140H p.G209V p.T307M p.F335L p.S347L p.F354S p.R409H p.T410M p.Q413P p.T416P p.G424D p.L445W p.T485R p.G497S p.L597S p.Q514K p.V609G p.F667C p.D724G p.G740V p.G740S p.R776C	p.L75L p.D710D	p.T94WfsX87 p.C400FfsX67 p.Q413RfsX54	c.416-1G>A c.1001+1G>A c.1001+5G>T c.1614+1GA	p.G102DfsX4

Observando la distribución de los 25 cambios *missense* identificados en la secuencia codificante de la pendrina, vemos que estos se encuentran repartidos por toda la proteína —región amino terminal, región de dominios transmembrana y región carboxilo terminal—, aunque es en el quinto lazo extracelular, codificado por el exón 10, donde se observa una mayor acumulación de cambios (un total de 4 cambios en 14 residuos), (Figura 1). La totalidad de cambios descritos en otros estudios (*Pendred/Bor home page*, www.healthcare.uiowa.edu/labs/pendredandbor), se distribuyen más o menos regularmente, con un valor medio de dos cambios cada 10 residuos en las tres

regiones y al igual que en nuestra muestra, también se detecta una mayor concentración de mutaciones en el quinto lazo extracelular (8 cambios en 14 residuos). La falta de información sobre la estructura/dominios de la familia SLC26 impide sacar conclusiones sobre estos hechos, pero se puede sugerir que esta región podría jugar un papel relevante en la regulación de la apertura del canal y/o en el anclaje de este a la membrana.

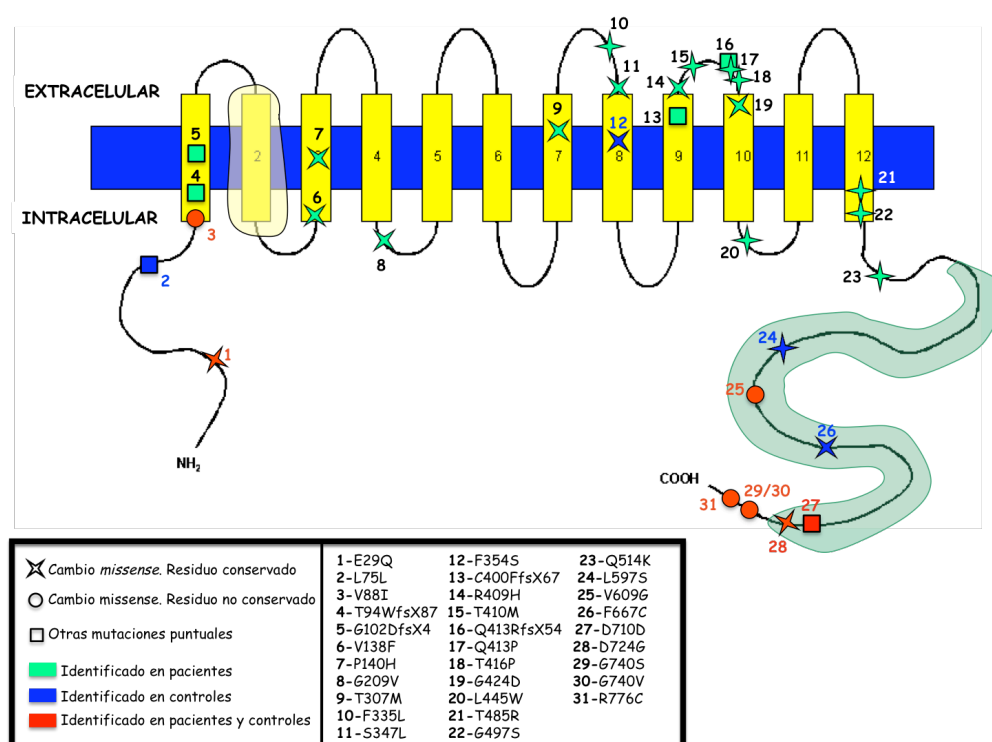


Figura 1. Localización en la pendrina de los cambios en la secuencia codificante del gen *SLC26A4* detectados en la población española. Sombreado en amarillo el dominio conservado “sulfate transporter”; en verde el dominio STAS.

1.1. Naturaleza patogénica de los cambios *missense*: análisis funcional

La validación de este tipo de mutaciones, por otro lado las más frecuentes del espectro mutacional del gen *SLC26A4*, no resultó una cuestión evidente. Los criterios más comúnmente utilizados para valorar la patogenicidad de estas variantes son: la conservación de los residuos afectados en los ortólogos SLC26A4 y la baja incidencia de los cambios en una población control. Sin embargo, en nuestra muestra, si bien la

mayoría (13/18) de los cambios *missense* que afectan a residuos conservados se encontraron exclusivamente en pacientes, dos de ellos fueron identificados tanto en pacientes como en controles (p.E29Q y p.D724G). Ambas variantes aparecieron con una baja frecuencia, en el mismo número de individuos afectados y sanos, creándonos serias dudas para su catalogación como polimorfismos o mutaciones patogénicas. En general, las mutaciones del gen *SLC26A4* son poco recurrentes, apareciendo en una o dos familias distintas (mutaciones “privadas”). Para minimizar los efectos del azar, decidimos utilizar una población control numerosa (n=214). Pese a ello, el estudio de la población normo-oyente no sólo no aclaró la situación, sino que provocó mayor confusión, ya que se identificaron tres cambios que afectan a residuos conservados — p.F354S, p.L597S y p.F667C— que no habían sido detectados en nuestros pacientes (Figura 1). A esto hay que añadir que estas tres mutaciones habían sido identificadas en otras muestras poblacionales en un número reducido de pacientes, siendo consideradas causantes de enfermedad (Tabla 2). Dado que estas variantes son poco frecuentes, es insólito encontrarlas en la muestra de población normo-oyente española pero no en la muestra de individuos afectados. Una exhaustiva revisión de la literatura nos permitió constatar que en la mayoría de los trabajos en los que aparecen estas mutaciones, sólo se investiga su incidencia en pequeñas muestras de población control (Tabla 2) y, únicamente se analizan controles, en los estudios que describen por primera vez el alelo en cuestión. Es probable que algunas de estas variantes, aunque afecten a residuos conservados, sean polimorfismos de baja frecuencia que, como vimos en resultados (p.V88I, V609G, R776C, etc.), aparecen con cierta frecuencia en el gen *SLC26A4*.

Por otra parte, otra evidencia que indica que alguno o varios de los cinco alelos que aparecen en nuestra muestra control (p.E29Q, p.F354S, p.L597S, p.F667C y p.D724G), deben ser polimorfismos, se deriva del cálculo de la prevalencia de las sorderas DFNB4. Si asumimos que dichos alelos (n=8) son causantes de enfermedad y teniendo en cuenta su frecuencia alélica, la frecuencia de portadores de alelos *SLC26A4* mutados en la población española, sería uno en 27. Lo que implicaría una prevalencia para la sordera recesiva DFNB4 de uno en 2900 nacidos vivos ($F = 1/(4 \times N^2)$; siendo F la frecuencia de portadores y N la frecuencia de alelos mutados), es decir, esta enfermedad por si sola sería responsable del 68% de las sorderas genéticas. Porcentaje que está claramente sobreestimado y muy por encima de lo publicado previamente en otros estudios clínicos y genéticos (Fraser 1965; Hutchin et al., 2005). En dichos trabajos se estima que 7-10 de cada 100.000 nacidos vivos presentan una hipoacusia

DFNB4, por lo que esperaríamos encontrar un portador de cada 50 individuos sanos (Fraser et al., 1965). Es decir, en nuestra muestra control (n=214) deberíamos obtener un número aproximado de cuatro portadores. Este criterio tampoco fue resolutivo a la hora de aclarar la naturaleza patogénica de nuestras mutaciones.

Dado que la sordera SLC26A4 es recesiva, también valoramos la presencia/ausencia de una mutación en el segundo alelo, en los pacientes portadores de alguna de las cinco variantes en cuestión (Tabla 2). Apreciamos diferencias notables entre los alelos p.E29Q y p.L597S. El primero va acompañado de una segunda mutación en cinco de los 6 pacientes en los que fue identificado. La variante p.L597S, que ha sido considerada por diversos autores como causante de enfermedad, sólo aparece acompañada de un segundo alelo mutante en tres de los 9 pacientes en que fue identificada. Este hecho junto con el hallazgo de cuatro alelos p.L597S, en individuos normo-oyentes (Albert et al., 2006), sugieren que este cambio probablemente sea polimórfico. Por el contrario, es posible que p.E29Q sea una mutación causante de enfermedad. En el caso del cambio p.F354S, a pesar de que en nuestra población control encontramos tres casos (1,4%), sólo ha sido identificada en dos pacientes de la población francesa uno con la segunda mutación y otro sin ella (Tabla 2), y no se identificó en ninguno de los 50 individuos normo-oyentes franceses. La serie de pacientes franceses analizados es amplia, se revisaron 30 pacientes con fenotipo PS (Blons et al., 2004) y 100 con sordera “EVA no sindrómica” (Albert et al., 2006), sin embargo el número de controles es bajo (n=50). Según estos datos consideramos probable que dicho alelo sea una variante polimórfica. Respecto a los cambios p.F667C y p.D724G, el escaso número de individuos afectados identificados, portadores de dichas mutaciones, impide hacer una valoración sobre su naturaleza.

Constatamos que las valoraciones anteriores no permiten concluir sobre la naturaleza de algunos cambios *missense* y ponen de manifiesto la necesidad de realizar estudios funcionales para validar dichas mutaciones.

Tabla 2. Mutaciones *SLC26A4* identificadas en población control que afectan a residuos conservados.

Mutación	Mutación en <i>trans</i>	Fenotipo	Publicación	Análisis de controles
p.E29Q	-	Un individuo normo-oyente	Pera, 2008b	1/214
	[p.V88I; p.R409H]	EVA	Pera, 2008a	
	p.T416P	EVA	Campbell, 2001	0/100
	p.M1T	EVA + 12% descarga de perclorato	Shears, 2004	-
	-	EVA/Mondini	Prasad, 2004	-
	p.L445W	EVA + >10% descarga de perclorato	Blons, 2004	-
	p.L445W	EVA	Albert, 2006	-
p.F354S	-	3 individuos normo-oyentes	Pera, 2008b	3/214
	p.Y530H	EVA + >10% descarga de perclorato	Blons, 2004	0/50
	-	EVA	Albert, 2006	-
p.L597S	-	Un individuo normo-oyente	Pera, 2008b	1/214
	-	4 individuos normo-oyentes	Albert, 2006	4/50
	-	EVA	Campbell, 2001	0/100
	-	EVA	Campbell, 2001	
	-	EVA	Campbell, 2001	
	-	EVA + >10% descarga de perclorato / EVA + <10% descarga de perclorato (hermanos)	Blons, 2004	-
	-	EVA + <15% descarga de perclorato	Pryor, 2005	-
	-	EVA + <15% descarga de perclorato	Pyor, 2005	
	-	EVA	Pyor, 2005	
	p.E384G	EVA + >15% descarga de perclorato	Pyor, 2005	
	c.1001+1G>A	EVA + >10% descarga de perclorato	Fugazzola, 2002	-
p.F667C	-	Un control normo-oyente	Pera, 2008b	1/214
	Homocigosis	EVA + Bocio	Everett, 1997	0/38
p.D724G	-	Dos controles normo-oyentes	Pera, 2008b	2/214
	p.T410M	Mondini	Pera, 2008a	
	p.T416P	EVA/Mondini	Prasad, 2004	0/100

En negrita alelos identificados en este trabajo

En vista de estos resultados, se procedió al análisis funcional en el que se incluyeron: las cinco variantes *missense* identificadas exclusivamente en pacientes españoles (p.P140H, p.Q413P, p.G424D, p.T485R y p.Q514K) y que afectan a residuos conservados; dos variantes que aunque también afectan a residuos conservados (p.E29Q y p.D724G), fueron identificadas en pacientes y controles; el cambio p.L597S que a pesar de ser una posición conservada únicamente se identificó en controles; la variante p.V88I detectada por primera vez en población española (pacientes y controles) que afecta a un residuo no conservado; y el doble mutante p.V88I-p.R409H. Para valorar la capacidad transportadora de las diferentes proteínas mutantes se empleó un método

fluorométrico que utiliza las propiedades fisico-químicas de la proteína fluorescente EYFP en presencia de haluros, principalmente I^- (ver resultados, apartado 7). Este método ha demostrado ser rápido y fiable (Dossena et al., 2006b; Fugazzola et al., 2007). Como vimos en resultados, los cambios p.P140H, p.Q413P, p.G424D, p.T485R y p.Q514K, afectan negativamente a la actividad transportadora de la pendrina. Así mismo, se confirmó la naturaleza patogénica de los cambios p.E29Q y p.D724G. En el caso de la variante p.L597S no se observó alteración en la actividad transportadora, al igual que ocurre con el cambio p.V88I; confirmándose por tanto la naturaleza polimórfica de ambas variantes.

También analizamos la naturaleza bioquímica del cambio de aminoácido producido por estas mutaciones *missense*. En concreto, observamos que la pérdida o ganancia, en la secuencia de la pendrina, de una prolina (p.Q413P, p.P140H, etc) o un aminoácido con carga (como ácido aspártico o glutámico, lisina o arginina e histidina) (p.Q514K, p.T485R, etc), conlleva la pérdida de la función transportadora.

Aunque se han identificado hasta el momento más de 160 variantes *SLC26A4*, únicamente se han realizado análisis funcionales de una treintena de ellas incluidos los 10 casos caracterizados en nuestro trabajo (Figura 2); en la mayoría de los trabajos, el transporte mediado por la pendrina se comprobó determinando la entrada o salida de I^{125} en distintos tipos celulares (Scott et al., 2000b; Taylor et al., 2002; Rotman-Pikielny et al., 2002; Gillam et al., 2004; Gillam et al., 2005; Dossena et al., 2006b; Fugazzola et al., 2007; Yoon et al., 2008). De las 32 mutaciones *missense* cuya funcionalidad ha sido analizada, 19 corresponden a este tipo de cambios (pérdida/ganancia de prolina o aminoácido cargado) y todas, excepto p.R776C (Pfarr et al., 2006), alteran la funcionalidad de la pendrina. Además, para confirmar esta “regla prolina/aminoácido cargado”, se llevó a cabo —mediante mutagénesis dirigida— la transformación de dos variantes polimórficas (p.V88I y p.L597S), en mutaciones que introducen una prolina (p.V88P y p.L597P) y por tanto deben seguir la regla. Como cabía esperar, el análisis funcional de estas nuevas variantes, resultó en una pérdida total de actividad transportadora (datos no mostrados; Pera et al., 2008b). Por otro lado, no hay que olvidar que 10 de los 32 cambios *missense* analizados aunque no implican estos cambios (pérdida/ganancia de prolina o aminoácido cargado), alteran la funcionalidad de la pendrina.

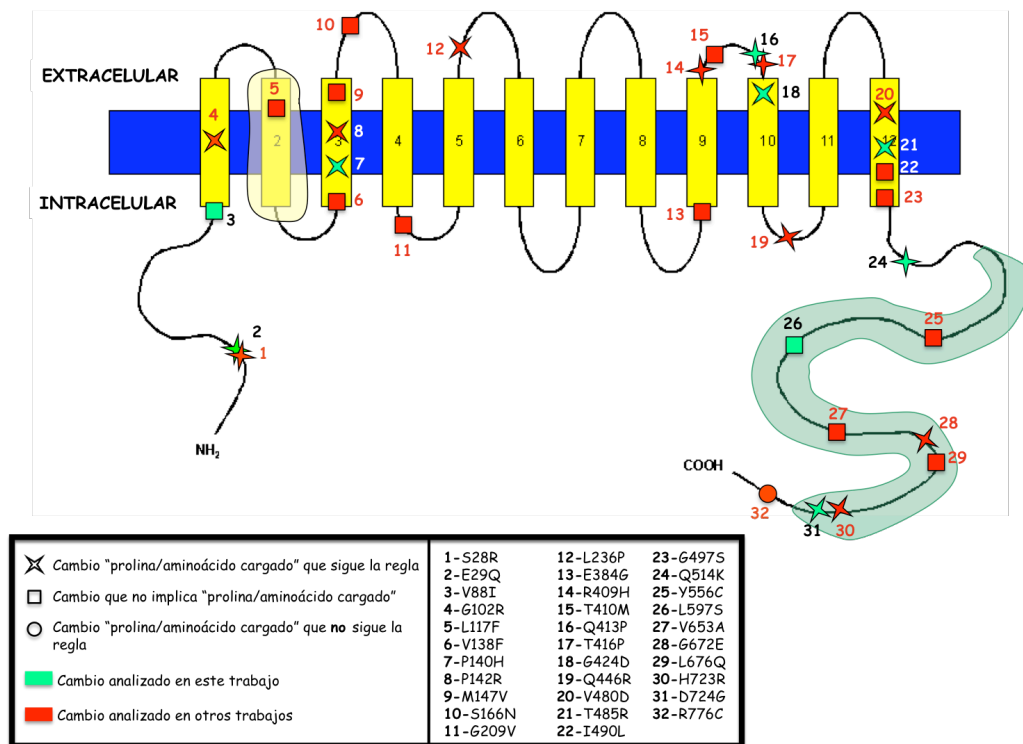


Figura 2. Localización en la pendrina de los cambios *missense* que han sido analizados, mediante estudios funcionales, en este u otros trabajos. Sombreado en amarillo el dominio conservado “*sulfate transporter*”; en verde el dominio STAS.

Como se observa en la figura 2, la única excepción a esta “regla”, el cambio p.R776C, está localizado al final del extremo carboxilo terminal, fuera del dominio STAS. Se ha descrito que la eliminación de los 44 amino ácidos finales del extremo carboxilo terminal del transportador SLC26A3, no afecta a su funcionalidad (Chernova et al., 2003). Por tanto, las mutaciones que, como p.R776C, ocurren en el extremo final de la región carboxilo terminal (Figura 2), probablemente afecten poco o nada a la actividad transportadora de la proteína.

Al igual que en nuestro análisis funcional, en otros trabajos se ha observado que algunos cambios producen una reducción en la actividad transportadora de la pendrina (“parcialmente funcionales”), mientras que otros anulan completamente su funcionalidad. Concretamente, en el trabajo de Scott et al. (2000b), observaron que tres alelos *SLC26A4* mutantes identificados en pacientes con fenotipo PS presentaban una pérdida total de la función transportadora; mientras que otros tres alelos mutantes

identificados en pacientes con sordera “EVA no sindrómica” eran parcialmente funcionales. Por tanto, los autores propusieron que el transporte residual de dichos alelos presentes en pacientes “EVA no sindrómicos”, era suficiente para dar lugar a un fenotipo más suave, sin alteraciones del tiroides. Sin embargo, en estudios posteriores (Taylor et al., 2002; Yoon et al., 2008), incluido el nuestro, se ha visto que ambos tipos de mutaciones ocurren por igual en pacientes PS y “EVA no sindrómicos”, con distintos grados de sordera.

Los resultados que aquí presentamos, muestran que cuando no es posible realizar análisis funcionales de las variantes *missense*, se deben valorar tres aspectos:

- El tipo de cambio bioquímico y la regla “prolina/aminoácido cargado”, anteriormente enunciada
- La conservación del residuo afectado
- La frecuencia de los cambios en muestras amplias de población control con el mismo origen étnico. El análisis de 100 alelos sanos es insuficiente ya que como hemos visto existen un gran número de polimorfismos de baja frecuencia en la secuencia codificante del gen *SLC26A4* que no parecen afectar a la funcionalidad de la proteína.

1.2. Caracterización de la mutación *de novo*

En diversos trabajos se ha sugerido que una de las causas de la alta heterogeneidad alélica del gen *SLC26A4* podría ser la presencia de mutaciones *de novo* en dicho gen (Prasad et al., 2004; Pryor et al., 2005). En este trabajo, gracias al análisis genético de los progenitores realizado sistemáticamente, hemos conseguido identificar el primer caso de PS (E343.1) causado por una mutación *de novo*, c.1238A>C (Q413P). La mutación p.Q413P fue identificada por primera vez en nuestro estudio y no se detectó en 425 individuos sordos no relacionados. Como consecuencia de este hallazgo, el diagnóstico indirecto mediante análisis de haplotipos no parece ser adecuado, siendo imprescindible para el consejo genético el análisis mutacional. Puesto que en la mayoría de los estudios moleculares que se han publicado, no se analizan los progenitores, no podemos valorar la frecuencia de las mutaciones *de novo* en el gen *SLC26A4*. Aunque según los resultados, la identificación de una mutación *de novo*, en una de 54 meiosis analizadas, parece apuntar que dicho gen pudiera tener una tasa de mutación elevada.

1.3. Caracterización de la delección g.8091T_22145Cdel

Puesto que uno de los pacientes “monoalélicos” (S129.3) presentaba los rasgos clásicos del PS, se investigó la posibilidad de que el segundo alelo *SLC26A4* mutado fuera una delección intragénica. El estudio consiguió confirmar la existencia de una delección, así como la caracterización de los puntos de rotura de esta (ver resultados, apartado 3.5). También confirmamos que dicha delección no está presente en ninguno de los pacientes sordos españoles, por lo que parece ser un tipo de delección no recurrente. Este tipo de mutaciones sólo han sido descritas en dos familias de origen asiático — IVS2-IVS3del 4kb (Park et al., 2003) y IVS4-IVS6del (Hu et al., 2007) —, la descripción de dichas delecciones es escasa, y no se aportan datos que permitan definir su extensión. Por otra parte, en ninguno de los estudios moleculares sobre el gen *SLC26A4* se han aplicado técnicas específicas para la identificación de delecciones no puntuales, por lo que no podemos conocer su frecuencia.

Para investigar los procesos genéticos que han originado la delección g.8091T_22145Cdel, se realizó un análisis (*in silico*) de las regiones adyacentes a los puntos de rotura (ver resultados, apartado 3.5). Aunque se encontraron diversas secuencias repetitivas, no se halló homología de secuencia entre ambas regiones. Este resultado descarta la recombinación desigual homóloga como mecanismo responsable del origen de esta mutación, por lo que es probable que se haya ocasionado por un mecanismo de recombinación no homóloga, favorecida por la presencia de diversos elementos recombinogénicos. De hecho, el punto de rotura 3' se encuentra en el extremo de un fragmento de DNA altamente desestabilizado con un alto potencial S/MAR (Scaffold attachment/matrix-associated region) que podría estar implicado en la formación de la delección, como ha sido publicado previamente (Albrecht et al., 2004; Xie et al., 2006). Las MAR o S/MAR, son secuencias de DNA de los cromosomas eucariotas que participan en la organización estructural de la cromatina en el núcleo. Estos elementos constituyen los puntos de anclaje del DNA para el armazón de la cromatina, organizándola en dominios estructurales. Se ha visto que la compleja y dinámica organización de la cromatina mediada por los elementos S/MAR juega un papel importante en la regulación de la expresión génica. Mientras que el S/MAR está protegido de los procesos de recombinación, los bordes de estos elementos son lugares de fragilidad genómica que favorecen la aparición de delecciones (Albrecht et al., 2004).

1.4. Comparación del espectro mutacional del gen *SLC26A4* en las distintas muestras poblacionales

El espectro mutacional del gen *SLC26A4* presenta una alta heterogeneidad alélica, y generalmente las distintas variantes *SLC26A4* son identificadas únicamente en una o dos familias. Pese a ello, en algunas muestras de pacientes, se han descrito algunos cambios más prevalentes. En concreto, en una muestra de la población coreana, los cambios p.H723R y IVS7-2A>G se identificaron en el 40% (18/45) y 20% (9/45) de los casos, respectivamente (Park et al., 2004); y en dos series de pacientes caucásicos (Norte de Europa), se identificaron cuatro mutaciones más frecuentes: p.L236P (30-23%, 7/23-10/44), p.T416P (22-16%, 5/23-7/44), c.1001+1G>A (21%, 9/44) y p.E384G (14%, 6/44) — (Coyle et al., 1998; van Hauwe et al., 1998). En nuestra muestra de pacientes españoles, estas mutaciones no se encuentran (p.H723R, IVS7-2A>G, p.L236P y p.E384G) o son poco frecuentes —p.T416P (6%, 2/35) y c.1001+1G>A (9%, 3/35) —. También es cierto que algunos alelos *SLC26A4*, como c.1001+1G>A, p.T416P o p.L445W, aparecen en casi todas las muestras poblacionales con frecuencias diferentes según las series/poblaciones.

Comparando el espectro mutacional español con el resto, encontramos grandes similitudes con los de Francia e Italia, y más especialmente con la población Francesa con la que compartimos 11 de las 35 variantes alélicas *SLC26A4* identificadas en la muestra analizada (pacientes y controles), incluyendo cambios patogénicos (X) y polimórficos (Y). En nuestro caso, el alelo mutado más frecuente es p.Q514K, identificado por primera vez en 5 familias afectadas (6 alelos) de la población española (Pera et al., 2008a) que representa el 16% del total de alelos *SLC26A4* patogénicos identificados (6/37), (ver resultados, Tabla 3). El hallazgo de un haplotipo STR común de los alelos p.Q514K, en diferentes cromosomas, indica que estos derivan de un ancestro común (efecto fundador).

Aunque en la población española no existe una mutación claramente mayoritaria —la p.Q514K solo da cuenta del 16% de los alelos—, vemos que el 100% de las familias de nuestra serie tienen una o las dos mutaciones en los exones 8, 10, 11 y 13 (ver resultados, Tabla 7). No obstante, teniendo en cuenta la amplitud del espectro mutacional, la baja prevalencia de las mutaciones y la existencia de cambios *missense* polimórficos es aconsejable analizar la secuencia codificante completa del gen *SLC26A4*.

2. CAUSAS GENETICAS DEL SINDROME DE PENDRED Y LA SORDERA “EVA NO SINDROMICA”

En 1965, se realizó un completo estudio clínico sobre el síndrome de Pendred, en él se determinó que esta enfermedad presenta un patrón de herencia autosómica recesiva (Fraser, 1965). Años después, tras el descubrimiento del gen *SLC26A4* (1997), diversos estudios se han centrado en el análisis genético de los pacientes afectados de síndrome de Pendred y sordera no sindrómica DFNB4 (“EVA no sindrómica”). En la mayoría de dichos trabajos se indica que ambas sorderas están causadas por la alteración de los dos alelos de dicho gen (Li et al., 1998; Reardon et al., 2000; Blons et al., 2004; Prasad et al., 2004). No obstante, en las distintas series de pacientes analizadas, la incidencia de casos “monoalélicos” resultó mayor de lo esperado; oscilando entre el 13% (4/30) y 30% (8/27) en los pacientes PS y entre 16% (16/100) y 50% (8/16) en los “EVA no sindrómicos” (Reardon et al., 2000; Campbell et al., 2001; Blons et al., 2004; Albert et al., 2006; Azaiez et al., 2007). En otros trabajos, sólo se describen casos “monoalélicos” en el grupo de pacientes con sordera “EVA no sindrómica”; mientras que los pacientes con fenotipo PS eran “bialélicos” (Tsukamoto et al., 2003; Pryor et al., 2005). La serie de pacientes de Tsukamoto et al., comprende 10 casos PS y 30 “EVA no sindrómicos” y la de Pryor et al., 9 casos PS y 22 “EVA no sindrómicos”. Entre los pacientes con fenotipo “EVA no sindrómico”, ambos autores describen una alta incidencia de casos “monoalélicos” (30%-45%). Cabe destacar que en la serie de Pryor et al., ninguno de los pacientes “EVA no sindrómicos” eran “bialélicos”; los pacientes con dicho fenotipo presentaban una o ninguna mutación. A raíz de estos resultados, Pryor et al., postulan que ambas enfermedades son clínica y genéticamente distintas; siendo la sordera “EVA no sindrómica” una alteración genéticamente heterogénea, frecuentemente causada por una única mutación *SLC26A4* en combinación con otros factores genéticos y/o ambientales. Apoyando esta teoría, Yang et al. (2007), proponen un modelo de herencia digénica. En dicho trabajo, se realiza un análisis mutacional de los genes *SLC26A4* y *FOXI1* en 429 individuos sordos con malformaciones del oído interno (EVA con o sin Mondini), los autores no presentan datos clínicos sobre la función tiroidea de los pacientes. Dicho análisis reveló que uno de estos pacientes (0,2%, 1/429) era portador de una mutación patogénica en *SLC26A4* (p.E29Q) y otra en *FOXI1* que anula la activación transcripcional de *SLC26A4* mediada por FOXI1, adjudicando a la combinación de mutaciones en ambos genes el fenotipo del paciente.

En nuestro estudio hemos realizado el análisis mutacional de un total de 67 casos independientes que constituyen los grupos de riesgo A, B, y C, además se analizaron 168 casos del grupo de “no riesgo” denominado D (ver materiales y métodos). En esta muestra identificamos mutaciones en 19 de los 67 casos del grupo de riesgo, y todos menos uno eran “bialélicos”. Además, todos los casos “bialélicos”, en los que fue posible un estudio de imagen (29/32), presentaban malformaciones bilaterales del oído interno. El único caso “monoalélico” identificado en el grupo de riesgo, presentaba malformaciones tipo EVA y sordera unilaterales (O.I.). En la literatura hay poca información a cerca de los casos unilaterales; la unilateralidad en el PS es rara y muy discutida. De hecho, según la clasificación de Pryor et al., los individuos que presentan malformaciones del oído interno unilaterales no se ajustan al fenotipo PS. Además, también en otros trabajos los casos unilaterales presentan una o ninguna mutación en *SLC26A4* (Blons et al., 2004; Pryor et al., 2005). Basándonos en estos hechos, el paciente “monoalélico” identificado en nuestra población de riesgo, también podría ser un portador casual.

En el grupo de “no riesgo”, por el contrario, únicamente se identificaron tres casos “monoalélicos” que no presentaban malformaciones del oído interno ni alteraciones del tiroides. Teniendo en cuenta que la incidencia de casos “monoalélicos” (3/168) en este grupo se corresponde con lo esperado (1 portador de 50) asumimos que estos casos son portadores casuales. Puesto que la presencia de malformaciones del oído interno es una característica constante de las sorderas ligadas a *DFNB4*, habría que destacar la importancia diagnóstica de los estudios de imagen (TAC y/o RM).

Nuestros resultados indican que las sorderas ligadas al locus *DFNB4* (síndrome de Pendred y sordera “EVA no sindrómica”) están causadas por la inactivación de los dos alelos del gen *SLC26A4*. En nuestra serie no hemos encontrado indicios de herencia digénica (*SLC26A4/FOXII*). El paciente “monoalélico” con sordera “EVA no sindrómica” no presenta mutaciones en *FOXII*. Tampoco se encontraron mutaciones *FOXII* en ninguno de los pacientes PS sin mutaciones en *SLC26A4*. No obstante, nuestros resultados no nos permiten valorar dicho modelo de herencia que es poco prevalente (0,2%) (Yang et al., 2007), dado que nuestra muestra es reducida.

Las diferencias observadas, en las distintas series analizadas, respecto a la incidencia de casos “monoalélicos” se pueden explicar en base a varios hechos: (i) la mala clasificación de las variantes alélicas *missense* —polimorfismos o cambios patogénicos—, que como hemos descrito en el capítulo anterior es una cuestión

compleja. En efecto, en el trabajo de Pryor et al. (2005), se incluyen entre los casos “monoalélicos”, individuos portadores de polimorfismos, como son: p.L597S, p.V609G, p.L117F y p.R776C. Solamente excluyendo los polimorfismos antes mencionados el porcentaje de casos “monoalélicos” en dicho trabajo, disminuye de un 32% (10/31) a un 16% (5/31). (ii) También hay que tener en cuenta, que los distintos trabajos presentan tasas de detección de mutaciones diferentes, lo cual podría explicar las diferencias encontradas respecto a la incidencia de casos “monoalélicos”.

Respecto a la heterogeneidad genética del PS y de la sordera “EVA no sindrómica”, es decir, la proporción de casos ligados al gen *SLC26A4* identificados en cada uno de los trabajos, muestra grandes diferencias, considerando únicamente los casos “bialélicos” (casos ligados). Estas diferencias en gran parte pueden ser debidas a los distintos criterios diagnósticos aplicados en los diferentes estudios para diferenciar la sordera PS de la sordera “EVA no sindrómica”. Es cierto que el único signo que distingue ambas hipoacusias es la presencia de bocio, que sabemos es dependiente de la edad. Alrededor del 30-50% de los casos con PS no desarrollan bocio hasta la segunda década de la vida. Aunque tampoco existe un tipo concreto de bocio asociado al PS (multinodular, difuso, eutiroideo, hipotiroideo, etc). En base a estas consideraciones, Pryor et al., establecen que el test de perclorato es la prueba diagnóstica determinante para la distinción clínica entre ambas sorderas (PS/“EVA no sindrómico”). Sin embargo, los resultados del test de perclorato son difíciles de comparar ya que no existe consenso en el protocolo utilizado para su realización; además, en la mayoría de los hospitales ya no se realiza dicha prueba al no existir una buena relación coste/beneficio; por otra parte, muchos pacientes no dan su consentimiento por ser una prueba radiactiva, y en los casos hipotiroideos es necesario suspender la medicación. De hecho, en nuestra serie de pacientes “bialélicos” dos pacientes con fenotipo PS (EVA+bocio) (familias S154 y S283) dieron un resultado negativo para el test del perclorato (ver resultados, Tabla 7), siendo muy probable que se trate de falsos negativos. Por otra parte, cuatro casos incluidos en nuestra serie de pacientes PS presentaban valores del test de perclorato >10%, considerados positivos por algunos autores (Blons et al., 2004), que sin embargo para otros como Pryor et al. (2005), son valores negativos. Como ya indicamos en el apartado de resultados, el criterio de Pryor et al. nos parece más correcto o verdadero ya que en dichos pacientes no identificamos ninguna mutación en el gen *SLC26A4*.

A pesar de todo ello, nuestros resultados se ajustan a los de Pryor, encontrando que la mayoría de pacientes con diagnóstico clínico certero de PS están ligados al locus *DFNB4* (dos mutaciones en *SLC26A4*). En lo relativo a los casos de sordera “EVA no sindrómica”, nuestros datos y los de otros trabajos, indican que el locus *DFNB4* aporta una exigua contribución a dicha hipoacusia, resultando ser una patología claramente heterogénea (Albert et al., 2006; Azaiez et al., 2007). Teniendo en cuenta que la aparición del bocio depende de la edad del paciente y puesto que, en nuestra serie, los casos “EVA no sindrómicos” “bialélicos” carecen del test de descarga del perclorato, es posible que, como se indica en el trabajo de Pryor, dichos pacientes presenten alteraciones en la organificación del I (test de perclorato positivo), pudiendo los más jóvenes desarrollar bocio a una edad más avanzada.

3. PREVALENCIA DE LAS SORDERAS PS/“EVA NO SINDROMICA” EN LA POBLACION ESPAÑOLA

Desde el estudio clínico relativo a la prevalencia del síndrome de Pendred realizado por Fraser en 1965, sólo se ha publicado un trabajo apoyado en datos moleculares (Hutchin et al., 2005). En dicho trabajo, se estudiaron 142 parejas de hermanos afectados de hipoacusia autosómica recesiva, de origen británico. La caracterización genética de estos individuos se llevó a cabo mediante análisis de ligamiento a diversos loci de sordera (incluido *DFNB4*), seguido —en los casos en que se encontró compatibilidad de ligamiento— de un análisis mutacional de los respectivos genes causantes de las sorderas. El resultado de este estudio mostró que en el 3,5% (5/142) de los casos, la sordera estaba causada por mutaciones en el gen *SLC26A4*. Por la escasa información relativa a la prevalencia de las sorderas ligadas a *DFNB4*, decidimos estudiar el conjunto de familias (n=192) diagnosticadas en el Servicio de Otorrinolaringología (ORL) del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona (ver pacientes y metodología), en el periodo comprendido entre los años 1999-2007, que fueron remitidas a nuestro laboratorio para su estudio genético. Aunque la muestra representa una pequeña parte de la población española, se eligió por que en dicho servicio de ORL se realiza de manera rutinaria a todos los pacientes, un estudio de imagen de ambos oídos (TAC y/o RM), complementario a las pruebas audiológicas. Además, en aquellos pacientes con malformaciones del oído interno, siempre que se obtuvo la autorización del paciente, se realizó el test de perclorato.

En el momento del diagnóstico los pacientes presentaban una edad que oscilaba entre los 2-40 años, siendo la mayoría individuos jóvenes (<18 años). El estudio de imagen reveló malformaciones del tipo EVA, acompañada o no de malformación de Mondini, en 24 de los pacientes; 18 de estos pacientes accedieron a realizarse el test de perclorato (Tabla 3).

Tabla 3. Pacientes con malformaciones del oído interno

		EVA positivos			
EDAD (años)		0-10	10-20	20-40	
Sin Test de Perclorato		2+1 ^a	1	1+1 ^{a, b}	n = 6
Test de Perclorato	Positivo	2+2 ^a	2	0	n = 6
	Negativo	5	5	2	n = 12

a, pacientes con dos mutaciones en *SLC26A4*

b, pacientes con bocio

Con respecto al tipo de herencia: el 80% (154/192) de los casos presentaban hipoacusia autosómica recesiva; el 7% (14/192) mostraban herencia dominante; en el 6% (11/192) herencia materna mitocondrial; y en el resto (7%, 13/192) no se pudo establecer el tipo de herencia. Los resultados del análisis mutacional de los casos índice de las 192 familias españolas, revelaron que 4 casos estaban causados por mutaciones en el gen *SLC26A4*. Tres de ellos presentaban fenotipo PS y uno sordera “EVA no sindrómica” (ver Tabla 3). Teniendo en cuenta únicamente los casos afectados de hipoacusia autosómica recesiva (n=154), en esta serie, las sorderas más prevalentes en el grupo de hipoacusias recesivas son las causadas por mutaciones en los genes: *GJB2-GJB6* (23%) seguidos de *SLC26A4* (3%) y *OTOF* (3%). Nuestro resultado no difiere significativamente de la estimación más reciente hecha por Hutchin et al., para la sordera ligada a *DFNB4* del 3,5% y reduce la estimación realizada por Fraser (1965) del 5-10%. Igualmente, encontramos que la prevalencia de las sorderas ligadas a *DFNB1* (genes *GJB2-GJB6*), se ajusta a lo descrito por nuestro laboratorio en series más amplias (del Castillo et al., 2002).

CONCLUSIONES

1. El espectro mutacional del gen *SLC26A4*, en la población española, muestra una alta heterogeneidad alélica y se compone mayoritariamente de mutaciones *missense*.
2. Los criterios más comunmente utilizados para valorar la naturaleza de los cambios *missense* del gen *SLC26A4* —baja incidencia de los cambios en población control y sustitución de aminoácidos conservados en ortólogos *SLC26A4*—, en algunos casos no resultaron concluyentes.
3. Hemos realizado un análisis funcional de 10 variantes *missense* identificadas en la población española. El análisis confirmó la naturaleza polimórfica del cambio p.L597S que había sido descrito como causante de enfermedad en varios trabajos.
4. Cuando no es posible realizar análisis funcionales, un criterio para predecir la naturaleza de los cambios *missense*, es la regla “prolina/aminoácido cargado”. El cambio será patogénico si produce pérdida o ganancia de una prolina o un aminoácido con carga, en la secuencia de la penndrina.
5. La mutación más frecuente es p.Q514K (16%). El análisis de haplotipos mostró un efecto fundador para dicha mutación en España.
6. La mutación p.Q413P es la primera mutación *de novo* identificada en el gen *SLC26A4*, en un paciente con síndrome de Pendred. El análisis genético confirmó que p.Q413P ocurre en el alelo paterno, en *trans* con p.L445W (alelo materno).
7. La delección g.8091T_22145Cdel, es la primera delección multiexónica del gen *SLC26A4* cuyos puntos de rotura han sido caracterizados.
8. Las sorderas DFNB4 (PS y “EVA no sindrómica”) están causadas por la inactivación de ambos alelos del gen *SLC26A4*. En la muestra española no encontramos evidencias de herencia digénica (*SLC26A4/FOXII*) para estas sorderas.
9. En las sorderas DFNB4 no existe correlación entre el fenotipo y el genotipo. Otros factores genéticos y/o ambientales podrían ser la causa de la variabilidad fenotípica de estas hipoacusias.
10. Las sorderas *DFNB4* representan un 3% de los casos de hipoacusias autosómicas recesivas, en la población española.

BIBLIOGRAFIA

Abe S, Usami S, Hoover DM, Cohn E, Shinkawa H, Kimberling WJ. Fluctuating sensorineural hearing loss associated with enlarged vestibular aqueduct maps to 7q31, the region containing the Pendred gene. *Am J Med Genet* 1999; 82(4): 322-8.

Abeyasinghe SS, Chuzhanova N, Krawczak M, et al. Translocation and gross deletion breakpoints in human inherited disease and cancer I: Nucleotide composition and recombination-associated motifs. *Hum Mutat* 2003; 22(3): 229-44.

Albert S, Blons H, Jonard L, et al. SLC26A4 gene is frequently involved in nonsyndromic hearing impairment with enlarged vestibular aqueduct in Caucasian populations. *Eur J Hum Genet* 2006; 14: 773–779.

Albrecht P, Bode J, Buiting K, Prashanth A K, Lohmann D R. Recurrent deletion of a region containing exon 24 of the RB1 gene caused by non-homologous recombination between a LINE-1HS and MER21B element. *J Med Genet* 2004; 41: e122.

Andersen PE. Radiology of Pendred's syndrome. *Adv Otorhinolaryngol* 1974; 21: 9-18.

Aravind L and Koonin EV. The STAS domain – a link between anion transporters and antisigma-factor antagonists. *Current biology* 2000; 10(2): R53-5.

Arellano B, Pera A, Ramírez-Camacho R, Villamar M, Trinidad A, García JR, Moreno F, Hernández-Chico C. Pendred's syndrome and non-syndromic DFNB4 deafness associated with the homozygous T410M mutation in the SLC26A4 gene in siblings. *Clin Genet* 2005; 67(5): 438-40.

Azaiez H, Yang T, Prasad S, et al. Genotype-phenotype correlations for SLC26A4-related deafness. *Hum Genet* 2007; 122(5): 451-7.

Baldwin CT, Weiss S, Farrer LA, et al. Linkage of congenital, recessive deafness (DFNB4) to chromosome 7q31 and evidence for genetic heterogeneity in the Middle Eastern Druze population. *Hum Mol Genet* 1995; 4(9): 1637-42

Bidart JM, Mian C, Lazar V, et al. Expression of pendrin and the Pendred syndrome (PDS) gene in human thyroid tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 2000a; 85(5): 2028-33.

Bidart JM, Lacroix L, Evain-Brion D, et al. Expression of Na⁺/I⁻ symporter and Pendred syndrome genes in trophoblast cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2000b; 85(11): 4367-72.

Blons H, Feldmann D, Duval V, et al. Screening of SLC26A4 (PDS) gene in Pendred's syndrome: a large spectrum of mutations in France and phenotypic heterogeneity. *Clin Genet* 2004; 66(4): 333-40.

Brain WR. Heredity in simple goiter. *QJM* 1927; 20: 303-19.

Braverman LE, Ingbar SH, Vagenakis AC, Adams L, Maloof F. Enhanced susceptibility to iodide myxedema in patients with Hashimoto's disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1971; 32: 515-521.

Byeon MK, Westerman MA, Maroulakou IG, et al. The down-regulated in adenoma (DRA) gene encodes an intestine-specific membrane glycoprotein. *Oncogene* 1996; 12(2): 387-96.

Campbell C, Cucci RA, Prasad S, et al. Pendred syndrome, DFNB4, and PDS/SLC26A4 identification of eight novel mutations and possible genotype-phenotype correlations. *Hum Mut* 2001; 13: 403-411.

Cherest H, Davidian JC, Thomas D, Benes V, Ansorge W, Surdin-Kerjan Y. Molecular characterization of two high affinity sulfate transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 1997; 145(3): 627-35.

Chernova MN, Jiang L, Shmukler BE, et al. Acute regulation of the SLC26A3 congenital chloride diarrhoea anion exchanger (DRA) expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Physiol.* 2003; 549: 3–19.

Coyle B, Reardon W, Herbrick JA, et al. Molecular analysis of the PDS gene in Pendred syndrome. *Hum Mol Genet* 1998; 7: 1105-1112.

Cremers CW, Admiraal RJ, Huygen PL, et al. Progressive hearing loss, hypoplasia of the cochlea and widened vestibular aqueducts are very common features in Pendred's syndrome. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 1998; 45(2): 113-23.

del Castillo I, Villamar M, Moreno-Pelayo MA, et al. A deletion involving the connexin 30 gene in nonsyndromic hearing impairment. *N Engl J Med* 2002; 346: 243-249.

DiCiommo DP, Duckett A, Burcescu I, Bremner R, Gallie BL. Retinoblastoma protein purification and transduction of retina and retinoblastoma cells using improved alphavirus vectors. *Invest. Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45: 3320-3329.

Dib C, Faure S, Fizames C, et al. A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. *Nature* 1996; 380: 152-154

Dossena S, Vezzoli V, Cerutti N, et al. Functional characterization of wild-type and a mutated form of SLC26A4 identified in a patient with Pendred syndrome. *Cell Physiol Biochem* 2006a; 17(5-6): 245-56.

Dossena S, Rodighiero S, Vezzoli V, et al. Fast Fluorometric Method for Measuring Pendrin (SLC26A4) Cl⁻/I⁻ Transport Activity. *Cell Physiol Biochem* 2006b; 18: 67-74.

Everett LA, Glaser B, Beck JC, et al. Pendred syndrome is caused by mutations in a putative sulphate transporter gene (PDS). *Nature Genet* 1997; 17: 411-421.

Everett LA, Morsli H, Wu DK, Green ED. Expression pattern of the mouse ortholog of the Pendred's syndrome gene (Pds) suggests a key role for pendrin in the inner ear. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 9727-9732.

Everett LA, Belyantseva IA, Noben-Trauth K, et al. Targeted disruption of mouse Pds provides insight about the inner-ear defects encountered in Pendred syndrome. *Hum Mol Genet*. 2001; 10(2): 153-61.

Fraser G.R. Association of congenital deafness with goitre (Pendred's syndrome): a study of 207 families. *Ann Hum Genet* 1965; 28: 201-249.

Fugazzola L, Cerutti N, Mannavola D, et al. Differential diagnosis between Pendred and pseudo-Pendred syndromes: clinical, radiologic and molecular studies. *Pediatric Research* 2002; 51(4):479-484.

Fugazzola L, Cirello V, Dossena S, et al. High phenotypic intrafamilial variability in patients with Pendred syndrome and a novel duplication in the SLC26A4 gene: clinical characterization and functional studies of the mutated SLC26A4 protein. *European Journal of Endocrinology* 2007; 157 331–338.

Ganguly A, Rock M J, Prockop DJ. Conformation-sensitive gel electrophoresis for rapid detection of single-base differences in double-stranded PCR products and DNA fragments: Evidence for solvent-induced bends in DNA heteroduplexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993; 90: 10325 –10329.

Gillam MP, Sidhaye AR, Lee EJ, Rutishauser J, Stephan CW, Kopp P. Functional characterization of pendrin in a polarized cell system. Evidence for pendrin-mediated apical iodide efflux. *J Biol Chem* 2004; 279(13):13004-10.

Gillam MP, Bartolone L, Kopp P, Bevenga S. Molecular analysis of the PDS gene in a nonconsanguineous Sicilian family with Pendred's syndrome. *Thyroid* 2005; 15: 734-741.

Greinwald JH, Wayne S, Chen AH, et al. Localization of a novel gen for nonsyndromic hearing loss (DFNB17) to chromosome 7q31. *Am J Med Genet* 1998; 78(2): 107-113.

Hawkesford M. Transporter gene families in plants: the sulphate transporter gene family - redundancy or specialization?. *Physiologia Plantarum* 2003; 117: 155-163.

Hu H, Wu L, Feng Y, et al. Molecular analysis of hearing loss associated with enlarged vestibular aqueduct in the mainland Chinese: a unique SLC26A4 mutation spectrum. *J Hum Genet* 2007; 52:492-497.

Hulander M, Kiernan AE, Blomqvist SR, et al. Lack of pendrin expression leads to deafness and expansion of the endolymphatic compartment in inner ears of Foxi 1 null mutant mice. *Development* 2003; 130(9): 2013-2025.

Hutchin T, Coy NN, Conlon H, et al. Assessment of the genetic causes of recessive childhood non-syndromic deafness in the UK - implications for genetic testing. *Clin Genet* 2005; 68(6):506-12

Hvidberg-Hansen, J and Jorgensen MB. The inner ear in Pendred's syndrome. *Acta Otolaryngol*, 1968; 66(1):129-35.

Kacem HH, Rebai A, Kaffel N, et al. PDS is a new susceptibility gene to autoimmune thyroid diseases: association and linkage study. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88(5): 2274-2280.

Karniski LP. Mutations in the diastrophic dysplasia sulfate transporter (DTDST) gene: correlation between sulphate transport activity and chondrodysplasia phenotype. *Hum Mol Genet* 2001; 10:1485–1490.

Keen J, Lester D, Ingelhearn C, Curtis A, Bhattacharya S. Rapid detection of single base mismatches as heteroduplexes on hydrolysis gels. *Trends Genet* 1991; 7:5.

Ko SB, Zeng W, Dorwart MR, et al. Gating of CFTR by the STAS domain of SLC26 transporters. *Nat Cell Biol* 2004; 6(4): 343-50.

Kopp P, Arseven OK, Sabacan L, et al. Phenocopies for deafness and goiter development in a large inbred Brazilian kindred with Pendred's syndrome associated with a novel mutation in the PDS gene. *J Clin Endocrinol Metabol* 1999; 84(1): 336-341.

Khurana OK, Coupland LA, Shelden MC, Howitt SM. Homologous mutations in two diverse sulfate transporters have similar effects. *FEBS Lett* 2000; 477:118–122.

Lacroix L, Mian C, Caillou B, Talbot M, Filetti S, Schlumberger M and Bidart JM. Na⁺/I⁻ symporter and Pendred syndrome gene and protein expressions in human extra-thyroidal tissues. *Eur J Endocrinol* 2001; 144:297-302.

Larsson C, Hellqvist M, Pierrou S, White I, Enerbäck S, Carlsson P. Chromosomal localization of six human forkhead genes, *FKHL1* (FKHL5), -3 (FKHL7), -4 (FKHL8), -5 (FKHL9), -6 (FKHL10), and -8 (FKHL12). *Genomics* 1995; 30(3):464-9.

Lerman LS, Silverstein K. Computational Simulation of DNA Melting and Its Application to Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Methods in Enzymology* 1989; 155: 482-501.

Li XC, Everett LA, Lalwani AK, et al. A mutation in PDS causes non-syndromic recessive deafness. *Nat Genet* 1998; 18:215-217.

Lohi H, Kujala M, Kerkela E, et al. Mapping of five new putative anion transporter genes in human and characterization of SLC26A6, a candidate gene for pancreatic anion exchanger. *Genomics* 2000; 70: 102-112.

Lopez-Bigas N, Melchionda S, de Cid R, et al. Identification of five new mutations of PDS/SLC26A4 in Mediterranean families with hearing impairment. *Hum Mutat* 2001; 18:548.

Masmoudi S, Charfedine I, Hmani M, et al. Pendred syndrome: phenotypic variability in two families carrying the same PDS missense mutation. *Am J Med Genet* 2000; 90:38-44.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl Acids Res* 1988; 16: 1215.

Morgans ME and Trotter WR. Association of congenital deafness with goiter. The nature of the thyroid defect. *Lancet* 1958; i:607-9.

Morton C. Genetics, genomics and gene discovery in the auditory system. *Hum Mol Genet* 2002; 11: 1229-40.

Mount DB and Romero MF. The SLC26 gene family of multifunctional anion exchangers. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 2004; 447:710–721.

Mustapha M, Salem N, Weil D, et al. Identification of a locus on chromosome 7q31, DFNB14, responsible for prelingual sensorineural non-syndromic deafness. *Eur J Hum Genet* 1998; 6: 548-551.

Myers RM, Maniatis T, Lerman LS. Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis. *Methods in Enzymology* 1987; 155: 501-527.

Palos F, García-Rendueles M, Araujo-Vilar D, et al. Pendred syndrome in two Galician families: insights into clinical phenotypes through cellular, genetic and molecular studies. *J Clin Endocrin Metab* 2008; 93(1): 267-77.

Park HJ, Shaukat S, Liu XZ, et al. Origins and frequencies of SLC26A4 (PDS) mutations in east and south Asians: global implications for the epidemiology of deafness. *J Med Genet* 2003; 40:242-8.

Pera A, Villamar M, Viñuela A, Gandía M, Medà C, Moreno F and Hernández-Chico C. A mutational analysis of the SLC26A4 gene in Spanish hearing-impaired families provides new insights into the genetic causes of Pendred syndrome and DFNB4 hearing loss. *Eur J Hum Genet* 2008a; 16:888-96.

Pera A, Dossena S, Rodighiero S, et al. Functional assessment of allelic variants in the *SLC26A4* gene involved in Pendred-Syndrome and non-syndromic EVA. *PNAS* 2008b; 105(47): 18608-13.

Petit C. From deafness genes to hearing mechanisms: harmony and counterpoint. *Trends Mol Med* 2006; 12(2): 57-64.

Pendred V. Deaf-mutism and goitre. *The Lancet* 1896; 2: 532.

Phelps PD, Coffey RA, Trembath RC, et al. Radiological Malformations of the ear in Pendred syndrome. *Clin Radiol* 1998 Apr; 53(4): 268-73.

Pfarr N, Borek G, Turk A, et al. Goitrous congenital hypothyroidism and hearing impairment associated with mutations in the TPO and SLC26A4/PDS genes. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91(7): 2678-81.

Pierrou S, Hellqvist M, Samuelsson L, Enerback S, Carlsson P. Cloning and characterization of seven human Forkhead proteins: binding site specificity and DNA bending. *EMBO J* 1994; 13: 5002-5012.

Prasad S, Kolln KA, Cucci RA, et al. Pendred syndrome and DFNB4-mutation screening of SLC26A4 by denaturing high-performance liquid chromatography and the identification of eleven novel mutations. *Am J Med Genet* 2004; 124A(1): 1-9.

Pryor SP, Madeo AC, Reynolds JC et al. SLC26A4/PDS genotype phenotype correlation in hearing loss with enlargement of the vestibular aqueduct (EVA): evidence that Pendred syndrome and non-syndromic EVA are distinct clinical and genetic entities. *J Med Genet* 2005; 42: 159-165.

Pushkin A, Abuladze N, Newman D, Muronets V, Sassani P, Tatishchev S, Kurtz I. The COOH termini of NBC3 and the 56-kDa H⁺-ATPase subunit are PDZ motifs involved in their interaction. *Am J Physiol Physiol*. 2003; 284(3): C667-73.

Reardon W, Mahoney CF, Trembath R, Jan H, Phelps PD. Enlarged vestibular aqueduct: a radiological marker of pendred syndrome, and mutation of the PDS gene. *QJM* 2000; 93(2): 99-104.

Roti E, Minelli R, Gardini E, et al. The Iodine Perchlorate Discharge Test before and after One Year of Methimazole Treatment of Hyperthyroid Graves' Disease. *JCE & M* 1994; 178: 795-799.

Rotman-Pikielny P, Hirschberg K, Maruvada P, et al. Retention of pendrin in the endoplasmic reticulum is a major mechanism for Pendred syndrome. *Hum Mol Genet* 2002; 11(21): 2625-33.

Royaux IE, Suzuki K, Mori A, et al. Pendrin, the protein encoded by the Pendred syndrome gene (PDS), is an apical porter of iodide in the thyroid and is regulated by thyroglobulin in FRTL-5 cells. *Endocrinology* 2000; 141: 839-845.

Royaux IE, Wall SM, Karniski LP, et al. Pendrin, encoded by the Pendred syndrome gene, resides in the apical region of renal intercalated cells and mediates bicarbonate secretion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(7): 297-302.

Royaux IE, Belyantseva IA, Wu T, Kachar B, Everett LA, Marcus DC, Green ED. Localization and functional studies of pendrin in the mouse inner ear provide insight about the etiology of deafness in pendred syndrome. *J Assoc Res Otolaryngol* 2003; 4(3): 394-404.

Saier MH Jr, Eng BH, Fard S, et al. Phylogenetic characterization of novel transport protein families revealed by genome analyses. *Biochimica et Biophysica Acta* 1999; 1422: 1-56.

Scott DA, Wang R, Kreman T M, Sheffield VC, Karnishki LP. The Pendred syndrome gene encodes a chloride-iodide transport protein. *Nat Genet* 1999; 4: 440-443.

Scott DA and Karniski LP. Human pendrin expressed in *Xenopus laevis* oocytes mediates chloride/formate exchange. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2000a; 278(1): C207-211.

Scott DA, Wang R, Kreman TM, et al. Functional differences of the PDS gene product are associated with phenotypic variation in patients with Pendred syndrome and non-syndromic hearing loss (DFNB4). *Hum Mol Genet* 2000b; 9(11): 1709-15.

Shears D, Conlon H, Murakami T, et al. Molecular heterogeneity in two families with auditory pigmentary syndromes: the role of neuroimaging and genetic analysis in deafness. *Clin Genet* 2004; 65: 384–389.

Sheffield VC, Cox DR, Lerman LS, Myers RM. Attachment of a 40-base-pair G+C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989; 86: 232-236.

Shibagaki, N, and Grossman, AR. Probing the function of STAS domains of the Arabidopsis sulfate transporters. *J. Biol. Chem.* 2004; 279:30791–30799.

Smanik PA, Liu Q, Furminger L, Ryu K, Xing S, Mazzaferri EL, Jhiang SM. Cloning of the human sodium iodide symporter. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 226: 339–345.

Suzuki K, Lavaroni S, Mori A, et al. Autoregulation of thyroid-specific gene transcription by thyroglobulin. *PNAS* 1998; 95: 8251–8256.

Suzuki K, Mori A, Lavaroni S, et al. In vivo expression of thyroid transcription factor-1 RNA and its relation to thyroid function and follicular heterogeneity: Identification of follicular thyroglobulin as a feedback suppressor of thyroid transcription factor-1 RNA levels and thyroglobulin synthesis. *Thyroid* 1999; 9: 319–331.

Suzuki K, Royaux IE, Everett LA, et al. Expression of PDS/Pds, the Pendred Syndrome Gene, in Endometrium. *J Clin Endocrinol & Metab* 2002; 87(2): 938–941.

Suzuki K and Kohn LD. Differential regulation of apical and basal iodide transporters in the thyroid by thyroglobulin. *J Endocrinol* 2006; 189(2): 247-55.

Taylor JP, Metcalfe RA, Watson PF, Weetman AP, Trembath RC. Mutations of the PDS gene, encoding pendrin, are associated with protein mislocalization and loss of iodide efflux: implications for thyroid dysfunction in Pendred syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87(4): 1778-84.

Tsukamoto K, Suzuki H, Harada D, et al. Distribution and frequencies of PDS (SLC26A4) mutations in Pendred syndrome and nonsyndromic hearing loss associated with enlarged vestibular aqueduct: a unique spectrum of mutations in Japanese. *Eur J Hum Genet* 2003; 11: 916-922.

Usami S, Abe S, Weston MD, et al. Non-syndromic hearing loss associated with enlarged vestibular aqueduct is caused by PDS mutations. *Hum Genet* 1999; 104:188-192.

Valvassori GE, Clemis JD. The large vestibular aqueduct syndrome. *Laryngoscope* 1978; 88(5): 723-8.

van den Hove MF, Croizet-Berger K, Jouret F, Guggino SE, Guggino WB, Devuyst O, Courtoy PJ. The loss of the chloride channel, ClC-5, delays apical iodide efflux and induces a euthyroid goiter in the mouse thyroid gland. *Endocrinology* 2006; 147(3): 1287-96.

van Hauwe P, Everett LA, Coucke P. Two frequent missense mutations in Pendred syndrome. *Hum Mol Genet* 1998; 7(7): 1099-1104.

Wangemann P. K⁺ cycling and the endocochlear potential. *Hearing Research* 2002; 165: 1-9.

Wangemann P, Itza EM, Albrecht B, et al. Loss of KCNJ10 protein expression abolishes endocochlear potential and causes deafness in Pendred syndrome mouse model. *BMC Med* 2004; 20(2): 30.

Wangemann P, Nakaya K, Wu T, et al. Loss of cochlear HCO₃⁻ secretion causes deafness via endolymphatic acidification and inhibition of Ca²⁺ reabsorption in a Pendred syndrome mouse model. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2007; 292(5): F1345-53.

White MB, Carvalho M, Derse D, O'Brien SJ, Dean M. Detecting single base substitutions as heteroduplexes polymorphism. *Genomics* 1992; 12: 301-306.

Willems PJ. Genetic causes of hearing loss. *N Engl J Med* 2000; 342: 1101-1109.

Wolff J. Perchlorate and the thyroid gland. *Pharmacol Rev* 1998; 50(1): 89–105.

Xie F, Wang X, Cooper DN, et al. A novel Alu-mediated 61-kb deletion of the von Willebrand factor (VWF) gene whose breakpoints co-locate with putative matrix attachment regions. *Blood Cells Mol Dis* 2006; 36(3): 385-91.

Yang T, Vidarsson H, Rodrigo-Blomqvist S, et al. Transcriptional Control of SLC26A4 Is Involved in Pendred Syndrome and Non-syndromic Enlargement of Vestibular Aqueduct (DFNB4). *Am J Hum Genet* 2007; 80(6): 1055-63.

Yoon J, Park H, Yoo S, et al. Mutants Heterogeneity in the processing defect of SLC26A4. *J Med Genet* 2008; 45(7): 411-9.

Yoshida A, Taniguchi S, Hisatome I, Royaux IE, Green ED, Kohn LD, and Suzuki K. Pendrin is an iodide-specific apical porter responsible for iodide efflux from thyroid cells. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2002; 87(7): 3356–3361.

Yoshida A, Hisatome I, Taniguchi S, et al. Mechanism of Iodide/Chloride Exchange by Pendrin. *Endocrinology* 2004; 145(9): 4301–4308

Zheng J, Long KB, Shen W, Madison LD and Dallos P. Prestin topology: localization of protein epitopes in relation to the plasma membrane. *Neuro Report* 2001; 12: 1929-1935.

